

14/10/05

1

PROCEDE DE PREPARATION DE FRAGMENTS D'ADN PAR FRAGMENTATION SELECTIVE D'ACIDES NUCLEIQUES ET SES APPLICATIONS.

L'invention concerne un procédé de préparation de fragments d'ADN par fragmentation sélective d'acides nucléiques et ses applications pour l'analyse des génomes et des transcriptomes.

Les techniques d'analyse des génomes et des transcriptomes d'espèces (animaux, végétaux, microorganismes) différentes ou bien de sous-groupes ou d'individus différents au sein de ces espèces, reposent sur la détection de marqueurs ou d'empreinte(s) génétique(s) par fragmentation de l'ADN (génome ou ADNc) à l'aide d'une ou plusieurs enzymes de restriction puis analyse, par tout moyen approprié des fragments d'ADN ainsi obtenus.

Ces techniques ont des applications dans des domaines extrêmement variés de la biologie comme la cartographie génétique, le génotypage d'espèces, de variétés, d'individus (animaux, végétaux, microorganismes), la détection de polymorphisme(s) (SNP ou *Single Nucleotide Polymorphism*) des gènes lié(s) à des caractères phénotypiques, notamment à des maladies, ainsi que l'établissement de profils d'expression géniques.

Toutefois, du fait notamment de la complexité des génomes, les techniques proposées ne permettent pas une analyse systématique à haut-débit des génomes et des transcriptomes par des techniques automatisées du type hybridation sur des puces à ADN. En effet :

- la technique RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) qui comprend l'analyse par Southern-blotting des fragments générés par les enzymes de restriction possède une faible résolution, dans la mesure où elle ne permet d'analyser qu'un seul ou, au plus, quelques *loci* en une seule réaction. En outre, les fragments obtenus ne peuvent pas être analysés par hybridation sur des puces à ADN du fait du nombre trop important de fragments générés, qui entraîne une saturation de la puce.
- la technique AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) décrite dans la Demande de brevet européenne (EP 0 534 858) au nom de KEYGENE, qui a été adaptée à l'analyse sur puces à ADN (Jaccoud et al., N.A.R., 2001, 29, 4^e25),

permet de réduire la complexité de l'échantillon de départ à une centaine de fragments par amplification sélective d'une fraction des fragments, par PCR à l'aide d'amorces comprenant en 3' de la séquence du site de restriction, une séquence spécifique de quelques bases (environ 1 à 10). Ainsi une paire d'amorces possédant n bases sélec-
5 tives permet en théorie d'amplifier uniquement une fraction $1/4^{2n}$ des fragments correspondant à ceux qui possèdent une séquence complémentaire de la séquence sélective, soit $1/16^{\text{ème}}$ et $1/256^{\text{ème}}$ des fragments pour respectivement $n = 1$ et $n = 2$.

- la technique d'amplification sélective de l'ADN par ligation d'adaptateurs (*Ligation-mediated PCR technique*) décrite notamment dans la Demande
10 EP 0735 144 au nom de RESEARCH DEVELOPMENT CORPORATION OF JAPAN et les articles aux noms de Zheleznaya et al., Biochemistry, 1995, 60, 1037-1043, et Smith et al., PCR Methods and Applications, 1992, 2, 21-27, permet de réduire la complexité de l'échantillon de départ par amplification sélective d'une fraction de fragments de restriction obtenus par clivage avec une enzyme de restriction de
15 type IIS et éventuellement de type IIN, puis ligation avec l'un des adaptateurs complémentaire de l'extrémité cohésive générée par ladite enzyme de type IIS et éventuellement IIN.

Toutefois, malgré la réduction de la complexité de l'échantillon de départ proposée dans les techniques précédentes, l'hybridation des cibles obtenues
20 (produits PCR de plusieurs centaines de paires de bases) sur des supports du type puces à ADN, c'est-à-dire de cibles avec des sondes de 10 à 20 bases est souvent de mauvaise qualité (signaux faibles, faux négatifs et faux positifs) pour les raisons suivantes :

- la présence de structures secondaires dans la cible diminue
25 l'efficacité de l'hybridation de la sonde, du fait de la diminution de l'accessibilité à la cible et de l'impossibilité d'optimiser les conditions d'hybridation en raison de la présence d'un grand nombre de fragments, de structures différentes, à hybrider avec une même sonde, et

- des réactions d'hybridation non-spécifique ou d'hybridation croisée
30 avec des séquences « non-cibles » possédant des similarités avec la séquence cible conduisant à des faux positifs qui réduisent la capacité à détecter de faibles quantités

de séquences spécifiques et la capacité de discrimination de ces techniques, du fait de l'augmentation du bruit de fond.

- le Brevet américain 6,258,539 au nom de THE PERKIN-ELMER CORPORATION préconise d'hybrider des cibles de petites tailles (environ 5 30 paires de bases) sur des supports du type puces à ADN ; les cibles sont générées à partir d'un fragment de restriction représentatif de l'ADNc à analyser, par : (i) ligation d'une des extrémités du fragment avec un adaptateur contenant le site de reconnaissance d'une enzyme de restriction de type IIS puis clivage de l'extrémité 5' dudit fragment par ladite enzyme de type IIS. Cette technique n'est pas adaptée à l'analyse 10 de populations complexes d'acides nucléiques comme des génomes ou des transcriptomes pour lesquels il est impossible d'obtenir un seul fragment de restriction représentatif de chaque molécule d'intérêt à analyser.

Il ressort de ce qui précède qu'il existe un réel besoin de disposer de méthodes d'analyse des génomes et des transcriptomes, mieux adaptées aux besoins de 15 la pratique, notamment en ce qu'elles sont à la fois fiables, reproductibles, sensibles, spécifiques, rapides et simples à mettre en œuvre. De telles méthodes, permettant ainsi d'analyser simultanément un grand nombre d'échantillons sur des supports du type puces à ADN, seraient donc parfaitement adaptées à l'analyse systématique des génomes et des transcriptomes pour les applications précitées.

20 C'est la raison pour laquelle les Inventeurs ont mis au point un procédé de préparation de fragments d'ADN par fragmentation sélective d'acides nucléiques (ADN génomique, ADNc rétro-transcrit à partir d'ARNm) qui permet avantageusement d'obtenir un ou plusieurs ensemble(s) de courts fragments d'ADN (inférieurs à 100 bases ou 100 paires de bases) représentatif(s) de la totalité du génome 25 ou du transcriptome à analyser ; ce procédé permet ainsi d'obtenir une hybridation à la fois rapide, efficace, fiable, reproductible, sensible et spécifique de molécules d'acides nucléiques cibles (ADN, ARN) avec des sondes oligonucléotidiques immobilisées sur des supports miniaturisés du type puce à ADN ; ledit procédé est utile aussi bien pour la préparation d'ADN-cibles aptes à s'hybrider avec des sondes nucléotidiques et en 30 particulier avec des sondes oligonucléotidiques immobilisées sur des supports miniaturisés du type puce à ADN (détection de marqueur(s) ou d'empreinte(s) génétique(s)), que pour la préparation de sondes à ADN, notamment de puces à ADN aptes à

s'hybrider avec des acides nucléiques –cibles (ADN, ARN), (préparation de marqueur(s) ou d'empreinte(s) génétique(s)).

La présente invention a ainsi pour objet un procédé de préparation de fragments d'ADN, à partir d'un échantillon d'acides nucléiques à analyser, lequel
5 procédé est caractérisé en ce qu'il comprend la fragmentation sélective desdits acides nucléiques à l'aide d'au moins les étapes suivantes (figure 1) :

I. Une première sélection de fragments courts comprenant :

a) la préparation de premiers fragments d'ADN double-brin F1 à l'aide d'au moins une enzyme de restriction E1, apte à fragmenter de manière aléa-
10 toire l'échantillon d'acides nucléiques à analyser, en générant lesdits fragments F1 d'ADN aux extrémités franches ou cohésives,

b) la ligation des extrémités desdits fragments F1 d'ADN obtenus à l'étape a) à au moins un adaptateur AA', de manière à former un motif – situé à la jonction de l'extrémité complémentaire dudit adaptateur et de l'extrémité 5' desdits
15 fragments F1, tel que :

- la séquence dudit motif est celle des N-x premières paires de bases du site de reconnaissance -à N paires de bases- d'une enzyme de restriction E2 dont le site de coupure est situé en aval dudit site de reconnaissance, avec $1 \leq x \leq N-1$ et

- son extrémité 3' –située en 5' desdits fragments d'ADN F1- est
20 celle du site de restriction de l'enzyme de restriction E1 (obtention de fragments F'1),

c) la coupure des fragments F'1 d'ADN obtenus en b) –à proximité de leur extrémité 5'- à l'aide de ladite enzyme de restriction E2, de façon à sélectionner une fraction de fragments courts F2,

d) la purification par tout moyen approprié de ladite fraction de
25 fragments courts F2,
et éventuellement,

II. Une deuxième sélection d'un ou plusieurs sous-ensembles de fragments à partir de la fraction de fragments courts F2 obtenue à l'étape d), conformément aux étapes suivantes (figure 3) :

30 e) la ligation de l'extrémité libre (non liée à l'adaptateur AA') de fragments courts F2 sélectionnés en c), à au moins un second adaptateur complémentaire BB' (obtention de fragments F'2), et

f) l'amplification des fragments courts F'2 liés auxdits adaptateurs (AA' et BB'), à l'aide d'au moins un couple d'amorces appropriées, l'une au moins étant éventuellement marquée à son extrémité 5', de façon à sélectionner au moins un sous-ensemble de fragments courts F'2, à partir de la fraction de fragments courts F2
5 obtenue en d).

Au sens de la présente invention on entend par :

- fragment d'ADN, un fragment d'ADN double-brin,
- fragment court F2 ou F'2, un fragment d'ADN inférieur à 100 paires de bases,
- fragment long F1 ou F'1, un fragment d'ADN de plusieurs centaines de paires
10 de bases,
- adaptateur, un oligonucléotide double brin d'au moins 6 paires de bases,
- extrémité 5' et extrémité 3', relativement à un fragment d'ADN, un adaptateur ou un site de reconnaissance ou de coupure d'une enzyme de restriction, respectivement l'extrémité 5' et l'extrémité 3' du brin positif dudit fragment
15 d'ADN, dudit adaptateur ou dudit site de reconnaissance ou de coupure d'une enzyme de restriction,
- extrémité libre, relativement à un fragment d'ADN, l'extrémité qui n'est pas liée à un adaptateur,
- extrémité complémentaire d'un adaptateur, l'extrémité dudit adaptateur qui se
20 lie à l'extrémité 3' ou 5' d'un fragment d'ADN ; lorsque ledit adaptateur se lie à l'extrémité 5' dudit fragment d'ADN, il s'agit de l'extrémité 3' dudit adaptateur et inversement,
- fraction de fragments, une fraction de fragments courts F2 préparée à partir des fragments (longs) F1 obtenus à l'étape a) ou une fraction de fragments courts
25 F'2, préparée à partir des fragments courts F2 ; les termes fraction, ensemble ou groupe sont considérés comme équivalents et employés indifféremment dans ce qui suit et il en va de même pour les termes sous-ensemble(s) et sous-groupe(s),
- site de coupure, le site de restriction d'une endonucléase (enzyme de restric-
30 tion) ; dans ce qui suit le terme site de coupure ou site de restriction sont employés indifféremment.

La combinaison des étapes a) à d) du procédé de préparation de fragments d'ADN selon l'invention permet avantageusement à la fois :

- d'obtenir des fragments courts F2 représentatifs de la totalité du génome ou du transcriptome à analyser, c'est-à-dire d'une longueur équivalente à celle des sondes oligonucléotidiques (figure 1), et

- de réduire la complexité de l'échantillon à analyser par une sélection à l'aide des adaptateurs AA' d'une fraction de fragments courts F2 représentatifs du génome ou du transcriptome à analyser (figure 2) ; une telle sélection permet d'éviter les problèmes de saturation du support du type puce à ADN utilisé pour l'hybridation.

La combinaison des étapes a) à f) du procédé de préparation de fragments d'ADN selon l'invention permet avantageusement à la fois (figure 2) :

- d'obtenir des fragments courts F'2 représentatifs de la totalité du génome ou du transcriptome à analyser, c'est-à-dire d'une longueur équivalente à celle des sondes oligonucléotidiques (figures 1 et 3) ;

- de réduire la complexité de l'échantillon à analyser par une première puis une deuxième sélection à l'aide des adaptateurs AA' et BB', d'un ou plusieurs sous-ensembles de fragments courts F'2 représentatifs du génome ou du transcriptome à analyser (figure 2) ; une telle sélection permet d'éviter les problèmes de saturation du support du type puce à ADN utilisé pour l'hybridation, et

- de détecter à partir de l'ensemble de fragments courts F2 un nombre maximum d'empreintes ou de marqueurs génétiques différents représentatifs du génome ou du transcriptome à analyser, par une deuxième sélection de sous-ensembles de cet ensemble de fragments courts F2 obtenus à l'étape d), à l'aide d'adaptateurs différents (B₁B₁', B₂B₂'..), (figures 2 et 3).

L'utilisation de tels fragments courts F2 ou F'2 comme cibles ou sondes dans des techniques d'hybridation sur puces à ADN, présente les avantages suivants par rapport aux techniques d'analyse de génomes ou de transcriptomes de l'art antérieur :

• fiabilité et reproductibilité

La fraction de fragments courts F2 qui est sélectionnée uniquement par ligation d'adaptateurs et coupure par des enzymes de restriction est représentative

de la totalité du génome ou du transcriptome à analyser. Ces fragments courts d'une part sont plus faciles à amplifier et d'autre part, permettent de travailler sur de l'ADN partiellement dégradé. En outre, la réduction de la complexité de l'échantillon à analyser par une première sélection, à l'aide de l'adaptateur AA', d'une fraction de fragments courts F2 représentatifs du génome ou du transcriptome à analyser, qui permet d'éviter les problèmes de saturation du support du type puce à ADN utilisé pour l'hybridation, contribue également à augmenter la fiabilité et la reproductibilité de l'analyse des génomes ou des transcriptomes.

- sensibilité et spécificité

La sensibilité et la spécificité de l'hybridation sont augmentées du fait de :

- la réduction de la taille des fragments à hybrider (cibles ou sondes de moins de 100 bases ou paires de bases au lieu de plusieurs centaines de bases ou de paires de bases dans les techniques de l'art antérieur) ; cette réduction diminue les réactions d'hybridation croisée et les faux positifs par élimination des « séquences non-cibles », et augmente le signal d'hybridation par diminution des structures secondaires de l'ADN,

- l'harmonisation des conditions d'hybridation (température) pour des fragments de taille homogène,

- la pureté de l'ADN (élimination de l'enzyme, des tampons et des longs fragments d'ADN restants.)

- simplicité

La fragmentation des acides nucléiques (cible ou sonde) comprend des étapes simples à mettre en œuvre (digestion enzymatique, ligation). En outre, l'optimisation de la longueur, de la structure et de la composition de l'ADN (cible ou sonde) permet d'obtenir une hybridation de bonne qualité (pas de faux positifs, peu de bruit de fond..) et donc de minimiser le nombre de contrôles nécessaires et par conséquent de réduire la complexité de la puce.

- rapidité

La durée d'hybridation est réduite de façon importante et est inférieure à 1 h (environ 15 à 20 min), au lieu de 12 h à 18 h dans les techniques de l'art antérieur.

- coût peu élevé

La réduction de la complexité de la puce permet de réduire le coût de cette dernière.

En raison de ces différents avantages, le procédé de préparation de fragments d'ADN par fragmentation sélective d'acides nucléiques selon l'invention est particulièrement bien adapté à :

- l'analyse rapide d'un grand nombre d'échantillons d'acides nucléiques-cibles (ADN génomique ou ADNc obtenu par rétro-transcription d'ARNm) sur des puces à ADN, et
- la préparation de sondes de taille réduite et contrôlée à partir d'ARN ou d'ADN génomique, notamment pour la fabrication de puces à ADN sur lesquelles sont immobilisées lesdites sondes représentant des marqueurs génétiques de génomes ou de transcriptomes.

Conformément au procédé de l'invention, les fragments F1 d'ADN double-brin de l'étape a) sont obtenus par les techniques classiques connues en elles mêmes. Par exemple, l'ADN génomique extrait de l'échantillon à analyser est fragmenté de façon aléatoire à l'aide d'une ou plusieurs enzymes de restriction E1 générant des fragments aux extrémités franches ou cohésives, sélectionnée(s) en fonction de leur fréquence de coupure de l'ADN à analyser, de façon à obtenir des fragments inférieurs à 1000 pb, de l'ordre de 200 à 400 pb. L'ARN (ARNm, ARN génomique d'un microorganisme...) est extrait de l'échantillon à analyser, converti en ADNc double brin par rétro-transcription puis fragmenté de façon analogue à l'ADN génomique. Parmi les endonucléases de restriction E1 utilisables pour couper l'ADN de mammifères, on peut citer de façon non-limitative : *EcoR I*, *BamH I*, *Pst I*, *Msp I*, *XmaC I*, *Eco 56I*, *Ksp I*, *Dra I*, *Ssp I*, *Sac I*, *BbvC I*, *Hind III*, *Sph I*, *Xba I* et *Apa I*.

Conformément à l'invention l'enzyme E1 génère soit des extrémités franches, soit des extrémités cohésives ; elle génère de préférence des extrémités cohésives qui ont l'avantage de permettre la ligation avec un seul adaptateur.

Conformément au procédé de l'invention, l'adaptateur tel que défini à l'étape b) est un oligonucléotide d'au moins 6 pb, formé de deux brins complémentaires (A et A') ; leur adaptateur, en B), est lié aux extrémités du dit fragment d'ADN

F1 par tout moyen approprié, connu en lui-même, notamment à l'aide d'une ligase à ADN, telle que la T4 ligase.

Conformément au procédé de l'invention, les étapes a) et b) sont réalisées successivement ou simultanément.

5 Conformément au procédé de l'invention, l'extrémité 3' du site de coupure de l'enzyme de restriction E1 et l'extrémité 5' du site de reconnaissance de l'enzyme de restriction E2 se chevauchent sur au moins une paire de bases (figure 2), ce qui permet de sélectionner une fraction de fragments courts F2 par coupure avec l'enzyme de restriction E2 ; ces fragments courts F2 sont issus de la fraction de fragments longs F'1 obtenus à l'étape b), qui comprend la totalité du site de reconnaissance de ladite enzyme de restriction E2 (N paires de bases). Parmi les enzymes de restriction E2, on peut citer de façon non-limitative : *Bpm I*, *Bsg I* et *BpuE I* qui coupent 16 nucléotides en aval de leur site de reconnaissance, et *Eci I*, *BsmF I*, *Fok I*, *Mme I* et *Mbo II* qui coupent respectivement 11, 10, 9, 20 et 8 nucléotides en aval de leur site de reconnaissance. Conformément au procédé de l'invention, le chevauchement desdits sites peut-être parfait (absence de misappariement) ou il peut comprendre au moins un misappariement (voir par exemple la paire de bases située en deuxième position du site *Ksp I* (enzyme de restriction E1) qui n'est pas complémentaire de la paire de base en première position du site *Eci I* (enzyme de restriction E2), figure 2) ; dans ce cas, la séquence du site de reconnaissance de l'enzyme de restriction E2 est restaurée par ligation avec un adaptateur dont l'extrémité est complémentaire dudit site de reconnaissance de l'enzyme de restriction E2 (adaptateur comprenant la séquence « GGC » à l'extrémité 3' du brin A dans l'exemple précité).

Le nombre 1 à N-1 de paires de bases du site de reconnaissance de l'enzyme de restriction E2 situées dans la région de la jonction de l'extrémité 3' complémentaire dudit adaptateur AA' et de l'extrémité 5' desdits fragments d'ADN F1 et la longueur dudit site de reconnaissance de l'enzyme de restriction E2, déterminent la fraction de fragments courts qui peut être sélectionnée à partir de l'ensemble des fragments (longs) F1 générés à l'étape a) ; pour un site de reconnaissance E2 de N pb et un chevauchement de n pb, entre E1 et E2, la fraction de fragments sélectionnés correspond à $1/4^{(N-n)}$, cette valeur étant augmentée d'un multiple de 2 pour toute paire de bases puriques ou pyrimidiques reconnue indifféremment par ladite enzyme de

restriction E2 (enzyme *Mme I*, figure 2). Ainsi, plus le chevauchement est important, plus le nombre de fragments contenus dans la fraction est grand (facteur de sélection ou de réduction de la complexité de l'échantillon faible), et inversement (facteur de sélection ou de réduction de la complexité de l'échantillon élevé), (figure 2).

5 Conformément au procédé de l'invention, la coupure à l'extrémité 5' des fragments longs F'1 à l'étape c), permet d'obtenir de courts fragments d'ADN F2 représentatifs du génome ou du transcriptome à analyser, susceptibles de contenir un marqueur génétique apte à être détecté par hybridation avec une sonde nucléotidique spécifique, en particulier un oligonucléotide complémentaire dudit marqueur génétique. Alternativement, lesdits fragments sont immobilisés sur un support solide du type puce à ADN et utilisés comme empreinte ou marqueur génétique pour analyser des génomes ou des transcriptomes.

Conformément au procédé de l'invention, la purification des fragments courts F2 -éventuellement simple-brin et/ou liés à un marqueur approprié (biotine, digoxygénine, fluorescéine)- (étape d), est réalisée par tout moyen approprié connu en lui-même, par exemple : la chromatographie d'exclusion, la filtration, la précipitation à l'aide de mélanges d'éthanol et d'acétate d'ammonium ou de sodium, la liaison à un support fonctionnalisé (billes magnétiques, billes de polymère non-magnétique ou surface d'or, couplées notamment à la streptavidine ou à un anticorps anti-digoxygénine, anti-fluorescéine).

Selon un mode de mise en œuvre avantageux du procédé selon l'invention, l'étape a) est réalisée avec deux enzymes de restriction E1 différentes, E1_A et E1_C, telles que :

- l'une au moins génère des extrémités cohésives, distinctes de celles éventuellement générées par l'autre enzyme de restriction, et
- l'extrémité 3' du site de restriction de E1_A est celle du motif tel que défini à l'étape b).

Selon une disposition avantageuse de ce mode de mise en œuvre, l'une des enzymes coupe fréquemment et l'autre rarement.

30 De préférence, l'enzyme qui coupe fréquemment est l'enzyme E1_A, laquelle enzyme E1_A génère au moins une extrémité d'un fragment F1, qui se lie à l'adaptateur AA' à l'étape b). L'enzyme E1_A est liée à l'enzyme E2 dans la mesure où,

l'extrémité 3' du site de restriction de E1_A correspond aux N-x premières paires de bases du site de reconnaissance de E2. L'enzyme E1_C génère au moins une extrémité d'un fragment F1-identique ou différent de celui généré par l'enzyme E1_A, laquelle extrémité se lie, à l'étape b), à un second adaptateur CC' qui est différent de l'adaptateur AA'. De manière préférée, l'extrémité 3' du site de restriction de E1_C est différente de celle des N-x premières paires de bases du site de reconnaissance de l'enzyme E2, telle que définie à l'étape b), de manière à ne pas reconstituer la séquence des N-x premières bases ou paires de bases du site de reconnaissance de l'enzyme de restriction E2, par ligation dudit adaptateur CC' à l'une au moins des extrémités desdits fragments d'ADN obtenus en a).

L'utilisation d'un tel couple d'enzymes, permet de réduire encore d'avantage la complexité de l'échantillon à analyser par une sélection supplémentaire d'un ensemble de fragments A=C, notamment par liaison à un support fonctionnalisé par un ligand du marqueur lié à l'extrémité 5' de l'adaptateur CC' (figures 7 et 8).

A titre d'exemple non-limitatif d'enzymes qui coupent l'ADN fréquemment, on peut citer celles dont le site de restriction possède 4 paires de bases comme *Msp I* et *Taq^α I*.

A titre d'exemple non-limitatif d'enzymes qui coupent l'ADN rarement, on peut citer celles dont le site de restriction possède 5 ou 6 paires de bases, comme *Pst I* et *EcoR I*. Selon un mode de mise en œuvre avantageux du procédé selon l'invention, il comprend une étape additionnelle de purification des fragments inférieurs à 1000 pb, préalablement à l'étape b) de ligation. Ladite purification est effectuée par tout moyen approprié connu en lui-même, notamment par séparation des produits de digestion obtenus en a) par électrophorèse en gel d'agarose, visualisation des bandes correspondant aux différents fragments obtenus, prélèvement de(s) bande(s) du gel correspondant aux fragments inférieurs à 1000 pb et extraction desdits fragments d'ADN double brin selon les techniques classiques.

Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux du procédé selon l'invention, l'adaptateur AA' tel que défini à l'étape b) comprend à l'extrémité 3' du brin A et/ou 5' du brin A', une zone 1 d'environ 1 à 8 bases ou paires de bases, identique ou complémentaire – en partie ou en totalité- au site de coupure de l'enzyme E1 ou E1_A, choisie de manière à reconstituer la séquence des N-x premières bases ou

paires de bases du site de reconnaissance de l'enzyme de restriction E2, par ligation dudit adaptateur AA' à l'une au moins des extrémités desdits fragments d'ADN obtenus en a). Ladite zone 1 peut éventuellement inclure un ou plusieurs misappariements avec la séquence dudit site de coupure de l'enzyme 1.

5 Selon encore un autre mode de mise en œuvre avantageux du procédé selon l'invention, l'adaptateur CC' tel que défini ci-dessus comprend à l'extrémité 3' du brin C et/ou 5' du brin C', une zone 1 d'environ 1 à 8 bases ou paires de bases, complémentaire – en partie ou en totalité- au site de coupure de l'enzyme E1_C ; ladite zone 1 peut éventuellement inclure un ou plusieurs misappariements avec
10 la séquence dudit site de coupure de l'enzyme E1_C. Ladite zone 1 qui est différente de la zone 1 de l'adaptateur AA' est choisie de manière à : (i) lier uniquement l'extrémité générée par l'enzyme E1_C mais pas celle générée par l'enzyme E1_A et (ii) ne pas reconstituer la séquence des N-x premières bases ou paires de bases du site de reconnaissance de l'enzyme de restriction E2, par ligation dudit adaptateur CC' à
15 l'une au moins des extrémités desdits fragments d'ADN obtenus en a).

 Selon encore un autre mode de mise en œuvre avantageux du procédé selon l'invention, l'adaptateur AA' tel que défini à l'étape b) ou l'adaptateur CC' tel que défini ci-dessus, comprennent en amont de la zone 1, une zone 2 d'au moins 6 paires de bases qui permet d'améliorer l'hybridation par allongement de l'adaptateur.
20 La séquence de cette zone 2 est sélectionnée par tout moyen approprié connu en lui-même, notamment à l'aide de logiciels de prédiction de séquences appropriés permettant d'optimiser la longueur, la structure et la composition des oligonucléotides (pourcentage de GC, absence de structures secondaires et/ou d'auto-appariement...) ; de préférence, ledit adaptateur comprend au moins une base située entre la zone 1 et la
25 zone 2, différente de celle qui dans le site de coupure de l'enzyme de restriction E1, est immédiatement adjacente à la séquence complémentaire précédente ; cette base permet de ne pas reconstituer ledit site de restriction après la ligation de l'adaptateur à l'étape b) et donc d'éviter le clivage de l'adaptateur lié à l'extrémité dudit fragment d'ADN double-brin.

30 Selon encore un autre mode de mise en œuvre avantageux du procédé selon l'invention, l'adaptateur AA' tel que défini à l'étape b) ou l'adaptateur CC' tel que défini ci-dessus comprennent un résidu de phosphate lié de

façon covalente à l'extrémité 5' du brin A' et/ou C ; ce résidu de phosphate permet à une enzyme comme la T4 ADN ligase de lier ledit adaptateur aux extrémités 3'-OH du fragment d'ADN double brin (F1), par l'intermédiaire d'une liaison phosphodiester.

5 Selon encore un autre mode de mise en œuvre avantageux du procédé selon l'invention, l'adaptateur AA' tel que défini à l'étape b) et/ou l'adaptateur CC' tel que défini ci-dessus sont liés à l'extrémité 5' du brin A et/ou C' à des marqueurs différents

 Selon une disposition avantageuse de ce mode de mise en œuvre,
10 l'extrémité 5' du brin C' de l'adaptateur CC' est liée à un marqueur qui peut se fixer sur un support solide fonctionnalisé.

 Les supports solides fonctionnalisés permettant de fixer les acides nucléiques sont connus de l'Homme du métier. A titre d'exemple non-limitatif, on peut citer notamment les billes magnétiques fonctionnalisées par la streptavidine
15 (liaison à une molécule d'acide nucléique marquée par la biotine), un anticorps anti-fluorescéine ou anti-digoxygénine (liaison à une molécule d'acide nucléique marquée par la fluorescéine ou la digoxygénine), ou bien encore d'autres support fonctionnalisés tels que des billes de polymère non-magnétiques ou une surface d'or, fonctionnalisées.

20 Selon une autre disposition avantageuse de ce mode de mise en œuvre, l'adaptateur AA' est lié à un marqueur permettant la détection d'hybrides d'acides nucléiques (ADN-ADN ou ADN-ARN), par exemple un fluorophore.

 Selon encore un autre mode de mise en œuvre avantageux du procédé selon l'invention, lorsque ledit procédé comprend une seule sélection de
25 fragments courts selon les étapes a) à d) telles que définies ci-dessus, il comprend au moins une étape additionnelle b'), c') et/ou d'), respectivement entre les étapes b) et c) ou c) et d), ou bien après l'étape d), d'amplification des fragments F'1 ou F2 à l'aide d'un couple d'amorces appropriées, de préférence un couple d'amorces marquées à l'aide d'un marqueur tel que défini ci-dessus.

30 De préférence, les fragments F'1 sont amplifiés à l'aide d'un couple d'amorces AA' ou AC' dans lequel la séquence des amorces A, A' et C' est celle de l'un des brins des adaptateurs AA' et CC' tels que définis ci-dessus, l'amorce A et/ou

l'amorce C' étant éventuellement liées en 5', respectivement par un marqueur permettant la détection d'hybrides d'acides nucléiques (ADN-ADN ou ADN-ARN) et un marqueur qui peut se fixer sur un support solide fonctionnalisé, tels que définis ci-dessus. De préférence, les fragments courts F2 sont liés en 3' avec un mélange d'adaptateurs complémentaires de l'ensemble des extrémités 3' des dits fragments F2 susceptibles d'être générés par ladite enzyme de restriction E2, puis lesdits fragments courts F2 sont amplifiés à l'aide d'une amorce (sens) A telle que définie ci-dessus, de préférence liée en 5' à un marqueur permettant la détection d'hybrides d'acides nucléiques (ADN-ADN ou ADN-ARN), et d'un mélange d'amorces anti-sens correspondant au mélange des séquences de l'un des brins du mélange d'adaptateur précédent.

Selon encore un autre mode de mise en œuvre avantageux du procédé selon l'invention, lorsque les étapes a) et b) sont réalisées, respectivement avec deux enzymes de restriction différentes E1_A et E1_C et deux adaptateurs différents AA' et CC' tels que l'adaptateur AA' ou CC' est lié à un marqueur qui peut se fixer sur un support solide fonctionnalisé, les fragments F'1 obtenus à l'étape b) ou b') sont mis en contact avec ledit support fonctionnalisé préalablement à l'étape c) de coupure, et la fraction de fragments courts F2 de l'étape d) correspond, à la fraction de fragments qui est, soit retenue sur ledit support (adaptateur AA' lié au marqueur qui se fixe sur le support), soit libre (adaptateur CC' lié au marqueur qui se fixe sur le support).

Ladite fraction libre est récupérée par tout moyen connu de l'Homme du métier, notamment par centrifugation ou aimantation du support fonctionnalisé (billes).

Ladite fraction retenue sur le support peut éventuellement être récupérée par dénaturation de l'ADN double-brin, notamment par la soude ou bien par amplification à l'aide d'un couple d'amorces appropriées, notamment avec une amorce A sens et un mélange d'amorces anti-sens tel que défini ci-dessus.

Conformément au procédé de l'invention, les dits fragments courts F2 obtenus à l'étape d) comprennent une extrémité constituée par l'adaptateur AA' et l'autre extrémité (extrémité libre) qui est de préférence cohesive, comprend une séquence aléatoire de quelques bases (inférieure à 10) générée par clivage avec

l'enzyme de restriction E2 (figure 2) ; en conséquence, il est possible de sélectionner un ou plusieurs sous-ensembles de fragments courts F'2 par ligation avec un adaptateur (BB') ou plusieurs adaptateurs différents (B_1B_1' , $B_2B_2'..$), chacun comprenant à l'extrémité 5' du brin B ou à l'extrémité 3' du brin B', une séquence cohésive spécifique de 1 à 10 bases, complémentaire de l'extrémité 3' d'un sous-ensemble de fragments courts F'2 (figure 3). Le ou lesdits sous-ensembles de fragments F'2 sont amplifiés, de façon indépendante ou simultanée, par PCR à l'aide d'un couple d'amorces dont la séquence est complémentaire de celle des brins A et B' des adaptateurs tels que définis ci-dessus.

10 Conformément au procédé de l'invention, l'adaptateur BB' tel que défini à l'étape e) est un oligonucléotide d'au moins 6 pb, formé de deux brins complémentaires (B et B'), sélectionné par tout moyen approprié connu en lui même, notamment à l'aide de logiciels de prédiction de séquences appropriés permettant d'optimiser la longueur, la structure et la composition des oligonucléotides (pourcentage de GC, absence de structures secondaires et/ou d'auto-appariement...).

Conformément au procédé de l'invention ledit adaptateur en e) est lié aux extrémités desdits fragments courts F2 par tout moyen approprié, connu en lui-même, notamment à l'aide d'une ligase à ADN, telle que la T4 ligase.

Conformément au procédé de l'invention, l'amplification de l'étape f) est réalisée notamment par PCR à l'aide d'un couple d'amorces dont les séquences sens et anti-sens sont respectivement, celles du brin A et du brin B' des adaptateurs tels que définis ci-dessus.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de mise en œuvre, l'étape e) comprend la ligation -de façon simultanée ou indépendante, de préférence indépendante- d'une extrémité des fragments courts F2 obtenus en d) à plusieurs adaptateurs différents (B_1B_1' , $B_2B_2'..$), chacun comprenant -à l'extrémité 5' du brin B ou à l'extrémité 3' du brin B'- une séquence spécifique de 1 à 10 bases, complémentaire de l'extrémité 3' libre dudit fragment court F2. Une telle disposition permet avantageusement d'obtenir des sous-groupes de fragments F'2, chacun correspondant à une empreinte ou à un marqueur génétique différent ; ainsi des adaptateurs possédant des séquences spécifiques de n bases permettent d'obtenir 4^n sous-groupes d'empreintes génétiques différentes (figure 2).

Selon une autre disposition avantageuse de ce mode de mise en œuvre, ledit adaptateur BB' (étape e) comprend un résidu de phosphate lié de façon covalente à l'extrémité 5' du brin B ; ce résidu de phosphate permet à une enzyme comme la T4 ADN ligase de lier ledit adaptateur à l'extrémité 3'-OH du fragment court F2, par l'intermédiaire d'une liaison phosphodiester.

Selon encore une autre disposition avantageuse de ce mode de mise en œuvre, l'une des amorces (étape f) est liée à son extrémité 5' à un marqueur approprié permettant la détection d'hybrides d'acides nucléiques (ADN-ADN ou ADN-ARN), par exemple un fluorophore.

Selon encore une autre disposition avantageuse des modes de mises en œuvre précédents, ils comprennent une étape additionnelle d'') ou g) d'obtention, par tout moyen approprié, de fragments simple-brin à partir des fragments courts F2 obtenus à l'étape d) ou d') ou bien des fragments courts F'2 obtenus à l'étape f). De préférence, l'un des brins du fragment court obtenu à l'étape d), d') ou f) est protégé à son extrémité 5' par un marqueur approprié ; un tel marqueur permet notamment d'éliminer le brin complémentaire par l'action de la phosphatase puis de la 5' exonucléase.

Selon encore une autre disposition avantageuse des modes de mises en œuvre précédents, ils comprennent une étape additionnelle de purification, par tout moyen approprié, des produits d'amplification obtenus à l'étape b'), c'), d') ou f) ou des fragments simple brin obtenus aux étapes d'') ou g).

La présente invention a également pour objet un fragment d'ADN, représentant un marqueur génétique susceptible d'être obtenu par le procédé tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il présente une séquence inférieure à 100 bases ou paires de bases comprenant au moins une séquence spécifique constituée par un fragment d'ADN génomique ou d'ADNc bordé respectivement par le site de reconnaissance et le site de clivage d'une enzyme de restriction E2 dont le site de clivage est situé en aval dudit site de reconnaissance, telle que l'extrémité 5' de ladite séquence spécifique correspond aux x dernières paires de bases du site de reconnaissance -à N paires de bases- de ladite enzyme E2, avec $1 \leq x \leq N-1$, ledit marqueur comportant à chaque extrémité au moins 5 bases ou 5 paires de bases de séquence non-spécifique.

Selon un mode de réalisation avantageux dudit fragment d'ADN, il s'agit d'un fragment simple-brin.

Selon un autre mode de réalisation avantageux dudit fragment d'ADN, il est lié à l'une de ses extrémités 5' à un marqueur approprié permettant la
5 détection d'hybrides d'acides nucléiques (ADN-ADN ou ARN-ADN), par exemple un fluorophore.

La présente invention a également pour objet un support approprié notamment un support miniaturisé du type puce à ADN comprenant ledit fragment d'ADN. Les supports sur lesquels on peut immobiliser des acides nucléiques sont
10 connus en eux-mêmes ; à titre d'exemple non-limitatif on peut citer ceux qui sont réalisés dans les matériaux suivants : plastique, nylon, verre, gel (agarose, acrylamide...) et silicium.

Outre les fragments d'ADN tels que définis ci-dessus, l'invention a également pour objet les mélanges de fragments d'ADN correspondant aux sous-
15 ensembles de fragments courts F'2 obtenus à l'étape f) ou g) ; lesdits fragments ou leurs mélanges tels que définis ci-dessus sont utiles comme marqueurs génétiques pour l'analyse de génomes et de transcriptomes, notamment pour la détection d'une espèce, d'une variété ou d'un individu (animal, végétal, microorganisme), la détection de polymorphisme des gènes, et pour l'établissement de profils d'expression géniques.

En conséquence, la présente invention a également pour objet
20 l'utilisation d'un fragment d'ADN tel que défini ci-dessus ou bien de mélanges de fragments d'ADN correspondant aux sous-ensembles de fragments courts F'2 obtenus à l'étape f) ou g) du procédé tel que défini ci-dessus, comme marqueurs génétiques.

La présente invention a également pour objet une méthode
25 d'hybridation d'acides nucléiques, caractérisée en ce qu'elle met en œuvre un fragment d'ADN tel que défini ci-dessus.

La présente invention a également pour objet un kit pour la mise en œuvre d'une méthode d'hybridation, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un fragment d'ADN (cible ou sonde) tel que défini ci-dessus ; de préférence, lorsque ledit
30 fragment est une cible, ledit kit comprend également une molécule d'acide nucléique complémentaire dudit fragment d'ADN, notamment une sonde oligonucléotidique.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'au moins un adaptateur AA' tel que défini ci-dessus, en combinaison avec une enzyme E2 telle que définie ci-dessus, pour la préparation de fragments d'ADN tels que définis ci-dessus.

5 La présente invention a également pour objet un kit pour la mise en œuvre du procédé tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un adaptateur AA' et une enzyme E2 tels que définis ci-dessus ; de préférence, ledit kit comprend également au moins un adaptateur BB' et un couple d'amorces tels que définis ci-dessus.

10 Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en œuvre du procédé selon l'invention et de son utilisation pour l'analyse de génomes par hybridation avec des sondes oligonucléotidiques immobilisées sur un support miniaturisé du type puce à ADN, ainsi qu'aux dessins annexés dans
15 lesquels :

- la figure 1 illustre les étapes a) à d) du procédé selon l'invention ; pour simplifier la figure, seul le brin A de l'adaptateur AA' est annoté,

- la figure 2 illustre à l'aide d'exemples de sites de coupure de l'enzyme de restriction E1 et de sites de reconnaissance de l'enzyme de restriction E2,
20 la fraction de fragments courts F2 qui est sélectionnée à l'étape d) et le nombre de sous-groupes potentiels d'empreintes obtenus à l'étape f), déduits à partir du nombre de bases sélectionnées, respectivement aux extrémités 5' (étape b) et 3' (étape e) desdits fragments courts d'ADN.

- la figure 3 illustre les étapes e) et f) du procédé selon l'invention ;
25 pour simplifier la figure, seuls les brins A et B des adaptateurs AA' et BB' sont annotés,

- les figures 4-1 à 4-3 illustrent un premier exemple des étapes a) à f) du procédé selon l'invention : figure 4-1 : étapes a et b, figure 4-2 : étapes c et d, figure 4-3 : étapes e et f ;

30 - étape a): les fragments d'ADN-double-brin sont générés par coupure avec *EcoRI* qui reconnaît le site GAATTC,

- étape b): l'adaptateur AA' (16/20 pb), comprend respectivement de 5' en 3': 15 paires de bases (zone 2 : GGAAGCCTAGCTGGA (SEQ ID NO:1) sur le brin A) et 1 pb de base non complémentaire du site *EcoR I* (C sur le brin A), ainsi que 4 bases complémentaires du site *EcoR I* (zone 1) incluant l'extrémité 5' du site *Mme I* (A) et un résidu de phosphate, à l'extrémité 5' du brin A' (5'phosphate-AATT). L'ADN ligase permet la liaison de l'adaptateur aux extrémités cohésives des fragments *EcoR I* par l'intermédiaire de liaisons phosphodiester, et

- étapes c) et d): les fragments liés à l'adaptateur sont coupés à l'aide de l'enzyme *Mme I* (enzyme E2) de façon à générer des fragments courts (45/43 pb) à partir des fragments qui ont restauré le site *Mme I* (TCCPuAC) par ligation de l'adaptateur AA' avec un fragment dont l'extrémité 5' correspond à la séquence CPuAC ; la sélection de 4 paires de bases spécifiques (CPuAC) permet de diminuer le nombre de fragments d'un facteur 128 (4x2x4x4), par rapport à l'échantillon de départ.

- étape d): les fragments courts obtenus à l'étape c) sont purifiés,
- étape e): les fragments courts purifiés à l'étape d) sont liés à l'une de leur extrémité à un adaptateur B₁B'₁' (14/16 pb) comprenant 2 bases complémentaires de l'extrémité dudit fragment (TT) à l'extrémité 3' du brin B'₁, et un groupement phosphate à l'extrémité 5' du brin B₁ ; la sélection de 2 bases spécifiques (AA) permet de diminuer le nombre de fragments d'un facteur 2048 (4x2x4x4x16) par rapport à l'échantillon de départ et d'obtenir des fragments courts de 59 paires de bases comprenant 28 paires de bases spécifiques de l'ADN à analyser, lesquels fragments correspondent à 16 sous-groupes potentiels d'empreintes génétiques,

- étape f): les fragments sélectionnés à l'étape e) sont amplifiés à l'aide d'amorces sens et anti-sens correspondant aux séquences complémentaires de respectivement les brins A et B'₁ des adaptateurs AA' et B₁B'₁.

- les figures 5-1 à 5-3 illustrent un deuxième exemple des étapes a) à f) du procédé selon l'invention : figure 5-1 : étapes a et b, figure 5-2 : étapes c et d, figure 5-3 : étapes e et f ;

- étape a): les fragments d'ADN-double-brin sont générés par coupure avec *BamH I* qui reconnaît le site GGATCC,

- étape b): l'adaptateur AA' (16/20 pb), comprend respectivement de 5' en 3': 15 paires de bases (zone 2 : GGAAGCCTAGCTGGA (SEQ ID NO:1) sur

- le brin A) et 1 pb de base non complémentaire du site *BamH I* (C sur le brin A), ainsi que 4 bases complémentaires du site *BamH I* (zone 1) incluant 2 bases de l'extrémité 5' du site *Mme I* (AG) et un résidu de phosphate, à l'extrémité 5' du brin A' (5'phosphate-GATC). L'ADN ligase permet la liaison de l'adaptateur aux extrémités
- 5 cohésives des fragments *BamH I* par l'intermédiaire de liaisons phosphodiester, et
- étapes c) et d): les fragments liés à l'adaptateur sont coupés à l'aide de l'enzyme *Mme I* (enzyme 2) de façon à générer des fragments courts (44/42 pb) à partir des fragments qui ont restauré le site *Mme I* (TCCPuAC) par ligation de l'adaptateur AA' avec un fragment dont l'extrémité 5' correspond à la séquence
- 10 PuAC ; la sélection de 3 paires de bases spécifiques (PuAC) permet de diminuer le nombre de fragments d'un facteur 32 (2x4x4) par rapport à l'échantillon de départ.
- étape d): les fragments courts obtenus à l'étape c) sont purifiés,
 - étape e): les fragments courts purifiés à l'étape d) sont liés à l'une de leur extrémité à un adaptateur B₁B₁' (14/16 pb) comprenant 2 bases complémentaires de l'extrémité dudit fragment (TT) à l'extrémité 3' du brin B'₁, et un groupe-
- 15 phosphate à l'extrémité 5' du brin B₁ ; la sélection de 2 bases spécifiques (AA) permet de diminuer le nombre de fragments d'un facteur 512 (2x4x4x16) par rapport à l'échantillon de départ et d'obtenir des fragments courts de 58 paires de bases comprenant 28 paires de bases spécifiques de l'ADN à analyser, lesquels fragments
- 20 correspondent à 16 sous-groupes potentiels d'empreintes génétiques,
- étape f): les fragments sélectionnés à l'étape e) sont amplifiés à l'aide d'amorces sens et anti-sens correspondant aux séquences complémentaires de respectivement les brins A et B'₁ des adaptateurs AA' et B₁B'₁.
 - les figures 6-1 à 6-3 illustrent un troisième exemple des étapes a) à
- 25 f) du procédé selon l'invention : figure 6-1 : étapes a et b, figure 6-2 : étapes c et d, figure 6-3 : étapes e et f ;
- étape a): les fragments d'ADN-double-brin sont générés par coupure avec *Ksp I* qui reconnaît le site CCGCGG,
 - étape b): l'adaptateur AA' (18/16 pb), comprend respectivement
- 30 de 5' en 3': 15 paires de bases (zone 2 : GGAAGCCTAGCTGGA (SEQ ID NO:1) sur le brin A), ainsi qu'une paire de bases de la séquence 5' du site *BamH I* (C sur le brin A), et 2 bases complémentaires du site *Ksp I* (GC sur le brin A) et un résidu de phosphate,

à l'extrémité 5' du brin A' ; ledit adaptateur incluant 3 bases de l'extrémité 5' du site *Eci I* (GGC). L'ADN ligase permet la liaison de l'adaptateur aux extrémités cohésives des fragments *Ksp I* par l'intermédiaire de liaisons phosphodiester, et

- étapes c) et d) : les fragments liés à l'adaptateur sont coupés à l'aide de l'enzyme *Eci I* (enzyme 2) de façon à générer des fragments courts à partir des fragments qui ont restauré le site *Eci I* (GGCGGA) par ligation de l'adaptateur AA' avec un fragment dont l'extrémité 5' correspond à la séquence A ; la sélection d'une paire de bases spécifiques permet de diminuer le nombre de fragments d'un facteur 4 par rapport à l'échantillon de départ.
- étape d) : les fragments courts obtenus à l'étape c) sont purifiés,
- étape e) : les fragments courts purifiés à l'étape d) sont liés à l'une de leur extrémité à un adaptateur B₁B₁' (14/16 pb) comprenant 2 bases complémentaires de l'extrémité dudit fragment (TT) à l'extrémité 3' du brin B₁, et un groupement phosphate à l'extrémité 5' du brin B₁ ; la sélection de 2 bases spécifiques (AA) permet de diminuer le nombre de fragments d'un facteur 64 (4x16) par rapport à l'échantillon de départ et d'obtenir des fragments courts comprenant 28 paires de bases spécifiques de l'ADN à analyser, lesquels fragments correspondent à 16 sous-groupes potentiels d'empreintes génétiques,
- étape f) : les fragments sélectionnés à l'étape e) sont amplifiés à l'aide d'amorces sens et anti-sens correspondant aux séquences complémentaires de respectivement les brins A et B₁ des adaptateurs AA' et B₁B₁,
- la figure 7 illustre un exemple de mise en œuvre du procédé selon l'invention à l'aide de deux enzymes E1 différentes (E1_A coupe fréquemment comme *Msp I* et *Taq^α I* et E1_C coupe rarement comme *Pst I*, *EcoR I*), de façon à réduire d'avantage la complexité de l'ADN à analyser, par introduction d'une sélection supplémentaire par la coupure par l'enzyme E1_C. Les séquences des sites de restriction sont indiquées dans le sens 5'→3' pour le brin positif. Les bases indiquées en gras restent sur le fragment d'intérêt après coupure. Les bases soulignées sont celles qui sont imposées par le couplage des enzymes E1_A et E2.
- la figure 8 illustre un exemple de mise en œuvre du procédé selon l'invention à l'aide de deux enzymes E1 différentes, de façon à sélectionner un

premier ensemble de fragments A=C puis une fraction de fragments courts F2 (étape c).

Exemple 1 : Préparation de courts fragments d'ADN (cible ou sonde) selon le procédé de l'invention.

5 La préparation des acides nucléiques, les digestions enzymatiques, les ligations, les amplification PCR et la purification des fragments ainsi obtenus, ont été réalisées en utilisant les techniques classiques, selon les protocoles standards tels que ceux décrits dans *Current Protocols in Molecular Biology (Frederick M. AUSUBEL, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA)*.

10 L'ADN génomique a été extrait à partir de sang de bovin, à l'aide du kit *PAXgene Blood DNA* (référence 761133, QIAGEN), selon les instructions du fabricant.

Les adaptateurs et les amorces suivants ont été synthétisés par MWG BIOTECH :

15 **-adaptateur AA'**

- brin A : 5'-GGAAGCCTAGCTGGAC-3' (SEQ ID NO:2)

- brin A' : 5' -P-AATTCTCCAGCTAGGCTTCC-3' (SEQ ID NO:3)

- adaptateur BB'

B : 5'-P- GGTGAGCACTCATC-3' (SEQ ID NO:4)

20 B' : 5'-GATGAGTGCTGACCTT-3' (SEQ ID NO:5)

- amorces

On peut utiliser indifféremment le couple d'amorces 1 :

Sens : 5'-CCTTCGGATCGACCTG-3' (SEQ ID NO:6)

Anti-sens : 5'-CTACTCACGAGTGGAA-3' (SEQ ID NO:7)

25 ou le couple d'amorces 2 :

Sens : 5'-GGAAGCCTAGCTGGAC-3' (SEQ ID NO:2)

Anti-sens : 5'-GATGAGTGCTGACCTT-3' (SEQ ID NO:5).

Le couple d'amorces 2 permet notamment de réutiliser une partie des séquences des adaptateurs.

30 Les fragments courts d'ADN (F2 et F'2) ont ensuite été préparés

1) Digestion de l'ADN génomique par *Eco RI* et ligation des fragments à l'adaptateur AA' (étapes a et b)

L'ADN génomique purifié (5 µg) et l'adaptateur (5 µg) ont été incubés, 3 h à 37 °C, dans 40 µl de tampon 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 10 mM DTT, 1 mM EDTA, 1 mM ATP et 1 mg BSA, contenant 50 UI d'*EcoR I* et 2 UI de T4 ADN-ligase. Les fragments d'ADN liés à leurs extrémités à l'adaptateur AA' ainsi obtenus ont été purifiés par précipitation dans un mélange 1 : 4 (V/V) d'acétate d'ammonium 3M et d'éthanol.

2) Digestion des fragments par *Mme I* et sélection des fragments courts F2 (étapes c) et d)

Le culot a été remis en suspension dans 40 µl de tampon 50 mM acétate de potassium, 20 mM Tris-acétate, 10 mM acétate de magnésium, 1 mM DTT, pH 7,9 et incubé 1 h à 37 °C en présence de 5 UI de *Mme I*.

3) Purification de la fraction de fragments courts F2 (étape d)

L'enzyme a été éliminée à l'aide du kit Micropure-EZ (MILLIPORE), les sels ont ensuite été éliminés par filtration (Microcon YM3) puis l'ADN retenu sur le filtre YM3 a été élué et les fragments courts ont été purifiés par filtration (Microcon YM 30 ou YM 50, MILLIPORE); les fragments d'ADN de moins de 100 pb correspondant à l'éluat, les fragments de plus grande taille étant retenus sur le filtre.

4) Ligation des fragments courts F2 à l'adaptateur BB' (étape e)

Les fragments courts obtenus à l'étape d) et l'adaptateur BB' (3 µg) ont été incubés, 3 h à 37 °C, dans 40 µl de tampon 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 10 mM DTT, 1 mM EDTA, 1 mM ATP et 1 mg BSA, contenant 2 UI de T4 ADN-ligase.

5) Amplification des fragments courts liés à l'adaptateur BB' (F'2) (étape f)

Les fragments courts liés à l'adaptateur BB' obtenus à l'étape e) ont ensuite été amplifiés par PCR à l'aide du couple sens et anti-sens, correspondant aux séquences complémentaires des brins A et B' des adaptateurs AA' et BB', dans un volume réactionnel de 50 µl contenant : 1 ng de fragments d'ADN, 150 ng de chacune des amorces et 2 UI d'AmpliTaq GOLD® (PERKIN ELMER) dans un tampon 15 mM Tris HCl, pH 8,0, 10 mM KCl, 5 mM MgCl₂ et 200 µM dNTPs. L'amplification

a été réalisée dans un thermocycleur, pendant 35 cycles comprenant : une étape de dénaturation à 94 ° C pendant 30 s, suivie d'une étape d'hybridation à 60 °C pendant 30 s et d'une étape d'extension à 72 °C pendant 2 min. Les fragments amplifiés par PCR ont été purifiés à l'aide du kit *MinElute PCR Purification* (référence LSKG, 5 QIAGEN), en suivant les instructions du fabricant.

L'enzyme, les sels et les dNTPs libres ont été éliminés par filtration sur Micropure-EZ (MILLIPORE) puis sur Microcon YM3 (MILLIPORE) et le produit d'amplification PCR retenu sur le filtre a ensuite été élué.

Exemple 2 : Utilisation des ADN-cibles pour hybrider des sondes oligonucléotidiques 10

Les fragments courts d'ADN double-brin (ADN-cibles) obtenus à l'exemple 1 ont été convertis en ADN simple-brin par digestion, 30 min à 37 °C, dans un volume réactionnel de 40 µl contenant 3.10^{-3} UI de 5'-exonucléase dans un tampon 0,02 M citrate d'ammonium, pH 5. L'enzyme, les sels et les dNTPs libres ont été éli- 15 minés par filtration sur Micropure-EZ (MILLIPORE) puis sur Microcon YM3 (MILLIPORE) et l'ADN simple-brin retenu sur le filtre a ensuite été élué.

Un support en verre du type puce à ADN, sur lequel sont immobilisées des sondes oligonucléotidiques dont certaines sont complémentaires des fragments d'ADN-cible obtenus à l'exemple 1, a été préparé selon les techniques connues 20 en elles-mêmes. Lesdits ADN-cibles ont ensuite été dilués dans du tampon d'hybridation (H7140, SIGMA) et 10 µl ont été déposés sur le support en verre, entre lame et lamelle. L'hybridation a ensuite été réalisée, en chambre humide dans un thermocycleur, dans les conditions suivantes : 80°C pendant 3 min, puis la température est abaissée à 50°C par palier de 0,1°C/s et enfin la température est maintenue à 25 50°C pendant 10 minutes. La réaction d'hybridation a ensuite été stoppée par dépôt des lames de verre sur la glace.

L'excès de fragments d'ADN-cible non-complémentaires des sondes a ensuite été éliminé par des lavages successifs : 30 s avec du SSC 2X (SIGMA, S6639), 30 s avec du SSC 2X additionné de 0,1 % SDS (L4522, SIGMA), et 30 s avec 30 du SSC 0,2X, à + 4°C.

Les lames de verre ont ensuite été séchées et l'hybridation a été visualisée et analysée à l'aide d'un scanner (modèle Gentaq, GENOMIC SOLUTION).

Exemple 3 : Préparation de courts fragments d'ADN à l'aide de deux enzymes

5 **E1 différentes E1_A et E1_C**

L'ADN génomique est préparé comme décrit à l'exemple 1.

Les adaptateurs et les amorces suivants ont été synthétisés :

- **adaptateur AA'** (complémentaire du site *Taq^α I*)

- brin A : 5'- GACGATGAGTCCTGAC-3' (SEQ ID NO : 8)

10 - brin A' : 5'-P- CGGTCAGGACTCATCGTC- 3'(SEQ ID NO: 9)

- **adaptateur CC'** (complémentaire du site *EcoR I*)

- brin C : 5'-P-AATTGGTACGCAGTCTAC-3'(SEQ ID NO : 10)

- brin C' : 5'-GTAGACTGCGTACC-3' (SEQ ID NO : 11)

- **amorces**

15 - amorce sens: 5'- Cy3-GACGATGAGTCCTGACCG-3' (SEQ ID NO : 12)

- amorce anti-sens: 5'-biotine-GTAGACTGCGTACCAATT-3' (SEQ ID NO : 13)

Les fragments courts d'ADN (F2) ont ensuite été préparés selon les étapes suivantes :

1) Digestion de l'ADN génomique par *Eco RI* et *Taq^α I* et ligation des fragments aux adaptateurs AA' et CC' (étapes a et b)

20

L'ADN génomique purifié (5 µg) et chacun des adaptateurs (5 µg de AA' et 5 µg de CC') ont été incubés, 3 h à 37 °C, dans 40 µl de tampon 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 10 mM DTT, 1 mM EDTA, 1 mM ATP et 1 mg BSA, contenant 50 UI d'*EcoR I*, 50 UI de *Taq^α I* et 2 UI de T4 ADN-ligase.

25 2) Amplification des fragments F'1

Les fragments d'ADN F'1 liés en 5' à l'adaptateur AA' et en 3' à l'adaptateur CC' ont été amplifiés à l'aide des amorces sens et antisens (SEQ ID NO : 8 et 11) dans un mélange réactionnel de 50 µl final contenant 1 µl de fragments ligués, 2 UI de polymérase (AmpliTaq Gold, PERKIN-ELMER), 150 ng de chacune des amorces, 200 µM de chacun des dNTPs dans un tampon Tris-HCl, pH 8, 10 mM KCl, 5 mM MgCl₂. L'amplification est réalisée dans les conditions suivantes : 35 cycles

30

comprenant une étape de dénaturation à 94°C pendant 30 s, une étape d'hybridation à 60°C pendant 30 s puis une étape d'élongation à 72 °C pendant 2 min.

3) Liaison des fragments F'1 (A=C) à des billes magnétiques fonctionnalisées

Les billes magnétiques fonctionnalisées par la streptavidine
5 (DYNAL ou MOLECULAR PROBES ; 500 µg) remises en suspension, sont placées à proximité d'un aimant pour former un culot, puis le surnageant est éliminé. Les billes sont rincées deux fois dans 50 µl de tampon (2 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA) puis remises en suspension dans 100 µl de tampon (1 M NaCl, 5 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,5 mM EDTA). Le produit de la réaction PCR (50 µl) est
10 ajouté à la suspension de billes, puis le mélange est agité fortement puis incubé sous agitation, pendant 30 min à température ambiante. Le surnageant est ensuite éliminé par aimantation comme ci-dessus, et les billes sont rincées avec 100 µl de tampon 0,1X SSC, 0,1 % SDS.

15 3) Digestion des fragments F'1 (A=C) par *BseR I* et purification des fragments courts F2 (étapes c et d))

Le culot formé par les billes a été remis en suspension dans 40 µl de tampon de réaction de l'enzyme *BseR I* et incubé 3 h à 37 °C en présence de 5 UI de *BseR I*. Les fragments courts F2 qui ont été libérés dans le milieu réactionnel sont récupérés.

20 4) Hybridation des ADN-cibles

Un support en verre du type puce à ADN, sur lequel sont immobilisées des sondes oligonucléotidiques dont certaines sont complémentaires des fragments d'ADN-cible obtenus, a été préparé selon les techniques connues en elles-mêmes. Lesdits ADN-cibles ont ensuite été dénaturés pendant 3 min à 95°C, dilués
25 dans du tampon d'hybridation (H7140, SIGMA) et 10 µl ont été déposés sur le support en verre, entre lame et lamelle. L'hybridation a ensuite été réalisée, en chambre humide, pendant 2 heures à 50 °C. La réaction d'hybridation a ensuite été stoppée par dépôt des lames de verre sur la glace.

L'excès de fragments d'ADN-cible non-complémentaires des sondes
30 a ensuite été éliminé par des lavages successifs : 30 s avec du SSC 2X (SIGMA S6639), 30 s avec du SSC 2X additionné de 0,1 % SDS (L4522, SIGMA), et 30 s avec du SSC 0,2X, à + 4°C.

Les lames de verre ont ensuite été séchées et l'hybridation a été visualisée et analysée à l'aide d'un scanner (modèle Gentaq, GENOMIC SOLUTION).

- 5 Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en œuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

REVENDICATIONS

1°) Procédé de préparation de fragments d'ADN, à partir d'un échantillon d'acides nucléiques à analyser, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend la fragmentation sélective desdits acides nucléiques à l'aide d'au moins les
5 étapes suivantes :

I. Une première sélection de fragments courts comprenant :

a) la préparation de premiers fragments d'ADN double-brin F1 à l'aide d'au moins une enzyme de restriction E1, apte à fragmenter de manière aléatoire l'échantillon d'acides nucléiques à analyser, en générant lesdits fragments F1
10 d'ADN aux extrémités franches ou cohésives,

b) la ligation des extrémités desdits fragments F1 d'ADN obtenus à l'étape a) à au moins un adaptateur AA', de manière à former un motif – situé à la jonction de l'extrémité complémentaire dudit adaptateur et de l'extrémité 5' desdits fragments F1, tel que :

15 - la séquence dudit motif est celle des N-x premières paires de bases du site de reconnaissance -à N paires de bases- d'une enzyme de restriction E2 dont le site de coupure est situé en aval dudit site de reconnaissance, avec $1 \leq x \leq N-1$ et

- son extrémité 3' –située en 5' desdits fragments d'ADN F1- est celle du site de restriction de l'enzyme de restriction E1, de manière à obtenir des
20 fragments d'ADN F'1,

c) la coupure des fragments F'1 d'ADN obtenus en b) –à proximité de leur extrémité 5'- à l'aide de ladite enzyme de restriction E2, de façon à sélectionner une fraction de fragments courts F2, et

d) la purification par tout moyen approprié de ladite fraction de fragments courts F2,
25 et éventuellement,

II. Une deuxième sélection d'un ou plusieurs sous-ensembles de fragments à partir de la fraction de fragments courts F2 obtenue à l'étape d), conformément aux étapes suivantes :

30 e) la ligation de l'extrémité libre (non liée à l'adaptateur AA') de fragments courts F2 obtenus en d) à au moins un second adaptateur complémentaire BB' (obtention de fragments F'2), et

f) l'amplification des fragments courts F'2 liés auxdits adaptateurs (AA' et BB'), à l'aide d'au moins un couple d'amorces appropriées, l'une au moins étant éventuellement marquée à son extrémité 5', de façon à sélectionner au moins un sous-ensemble de fragments courts F'2, à partir de la fraction de fragments courts F2
5 obtenue en d).

2°) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'étape a) est réalisée avec deux enzymes de restriction E1 différentes, E1_A et E1_C, telles que :

- l'une au moins génère des extrémités cohésives, distinctes de celles éventuellement générées par l'autre enzyme de restriction, et

10 - l'extrémité 3' du site de restriction de E1_A est celle du motif tel que défini à l'étape b).

3°) Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'une des enzymes coupe fréquemment et l'autre rarement.

4°) Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que :

15 - l'enzyme qui coupe fréquemment est l'enzyme E1_A, laquelle enzyme E1_A génère au moins une extrémité d'un fragment F1, qui se lie à l'adaptateur AA' à l'étape b), et

- l'enzyme E1_C qui coupe rarement, génère au moins une extrémité d'un fragment F1, qui se lie à l'étape b), à un second adaptateur CC' qui est différent
20 de l'adaptateur AA'.

5°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que les étapes a) et b) sont réalisées simultanément.

6°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il comprend une étape additionnelle de purification des fragments infé-
25 rieurs à 1000 pb, préalablement à l'étape b) de ligation.

7°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que l'adaptateur AA' tel que défini à l'étape b) comprend à l'extrémité 3' du brin A et/ou 5' du brin A', une zone 1 d'environ 1 à 8 bases ou paires de bases qui est identique ou complémentaire- en totalité ou en partie- au site de restriction de
30 l'enzyme E1, laquelle zone 1 est choisie de manière à reconstituer la séquence des N-x premières bases ou paires de bases du site de reconnaissance de l'enzyme de restric-

tion E2, par ligation dudit adaptateur AA' aux extrémités desdits fragments d'ADN obtenus en a).

8°) Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que ladite zone 1 inclut un ou plusieurs misappariements avec la séquence dudit site de coupure de l'enzyme de restriction E1.

9°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que l'adaptateur tel que défini à l'étape b) comprend en amont de la zone 1, une zone 2 d'au moins 6 paires de bases.

10°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que l'adaptateur tel que défini à l'étape b) comprend au moins une base située entre la zone 1 et la zone 2, différente de celle qui dans le site de coupure de l'enzyme de restriction E1, est immédiatement adjacente à la séquence complémentaire correspondant à la zone 1.

11°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que l'adaptateur tel que défini à l'étape b) comprend un résidu de phosphate lié de façon covalente à l'extrémité 5' du brin A'.

12°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que lorsque ledit procédé consiste en une seule sélection de fragments courts selon les étapes a) à d), il comprend au moins une étape additionnelle b'), c') et/ou d'), d'amplification des fragments F'1 ou F2 à l'aide d'un couple d'amorces appropriées, de préférence un couple d'amorces marquées.

13°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que l'adaptateur AA' tel que défini à l'étape b) est lié à l'extrémité 5' de son brin A à un marqueur approprié, notamment un marqueur qui permet la détection d'hybrides d'acides nucléiques ou un marqueur qui peut se fixer sur un support solide fonctionnalisé.

14°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 13, caractérisé en ce que l'extrémité 5' du brin C' de l'adaptateur CC' est liée à un marqueur, lequel marqueur peut se fixer sur un support solide fonctionnalisé.

15°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 12 à 14, caractérisé en ce que les fragments 1 à 10 obtenus à l'étape b) ou c) sont mis en contact avec ledit support fonctionnalisé préalablement à l'étape c) de coupure, et la fraction

de fragments courts F2 de l'étape d) correspond, à la fraction de fragments qui est, soit retenue sur ledit support (adaptateur AA' lié au marqueur qui se fixe sur le support), soit libre (adaptateur CC' lié au marqueur qui se fixe sur le support).

16°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11 et 13
5 à 15, caractérisé en ce qu'il comprend à l'étape e), la ligation de plusieurs adaptateurs complémentaires différents (B_1B_1' , B_2B_2' ...), chacun comprenant, à l'extrémité 5' du brin B ou à l'extrémité 3' du brin B', une séquence spécifique de 1 à 10 bases.

17°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11 et 13
à 16, caractérisé en ce ledit adaptateur BB' tel que défini à l'étape e) comprend un
10 résidu de phosphate lié de façon covalente à l'extrémité 5' du brin B.

18°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11 et 13
à 17, caractérisé en ce que l'une des amorces telles que définies à l'étape f) est liée à son extrémité 5' à un marqueur approprié.

19°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 18,
15 caractérisé en ce qu'il comprend une étape additionnelle d'') ou g) d'obtention, par tout moyen approprié, de fragments simple-brin à partir des fragments courts F2 obtenus à l'étape d) ou d'') ou bien des fragments courts F'2 obtenus à l'étape f).

20°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 19,
caractérisé en ce qu'il comprend une étape additionnelle de purification, par tout
20 moyen approprié, des produits d'amplification obtenus à l'étape b'), c'), d') ou f) ou des fragments simple brin obtenus à l'étape d'') ou g).

21°) Fragment court d'ADN, représentant un marqueur génétique susceptible d'être obtenu par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 20, caractérisé en ce qu'il présente une séquence inférieure à 100 bases ou paires de
25 bases, comprenant au moins une séquence spécifique constituée par un fragment de séquence génomique ou de séquence d'ADNc bordé respectivement par le site de reconnaissance et le site de clivage d'une enzyme de restriction E2 dont le site de clivage est situé en aval dudit site de reconnaissance, telle que l'extrémité 5' de ladite séquence spécifique correspond aux x dernières paires de bases du site de
30 reconnaissance -à N paires de bases- de ladite enzyme E2, avec $1 \leq x \leq N-1$, ledit marqueur incluant à chaque extrémité au moins 6 bases ou 6 paires de bases de séquence non-spécifique.

22°) Fragment d'ADN selon la revendication 21, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un fragment simple-brin.

23°) Fragment d'ADN selon la revendication 21 ou la revendication 22, caractérisé en ce qu'il est lié à l'une de ses extrémités 5' à un marqueur approprié.

5 24°) Puce à ADN, caractérisée en ce qu'elle comprend un fragment d'ADN selon l'une quelconque des revendications 21 à 23.

25°) Utilisation d'un fragment d'ADN selon l'une quelconque des revendications 21 à 23 comme marqueur génétique.

10 26°) Utilisation d'un mélange de fragments d'ADN tel que défini à l'étape d) ou f) du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 20, à l'étape d') du procédé selon la revendication 12 ou à l'étape d'') ou g) du procédé selon la revendication 19, comme marqueur génétique.

15 27°) Méthode d'hybridation d'acides nucléiques, caractérisée en ce qu'elle met en œuvre un fragment d'ADN selon l'une quelconque des revendications 21 à 23 ou une puce à ADN selon la revendication 24.

28°) Kit pour la mise en œuvre d'une méthode d'hybridation, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un fragment d'ADN selon l'une quelconque des revendications 21 à 23 ou une puce à ADN selon la revendication 24.

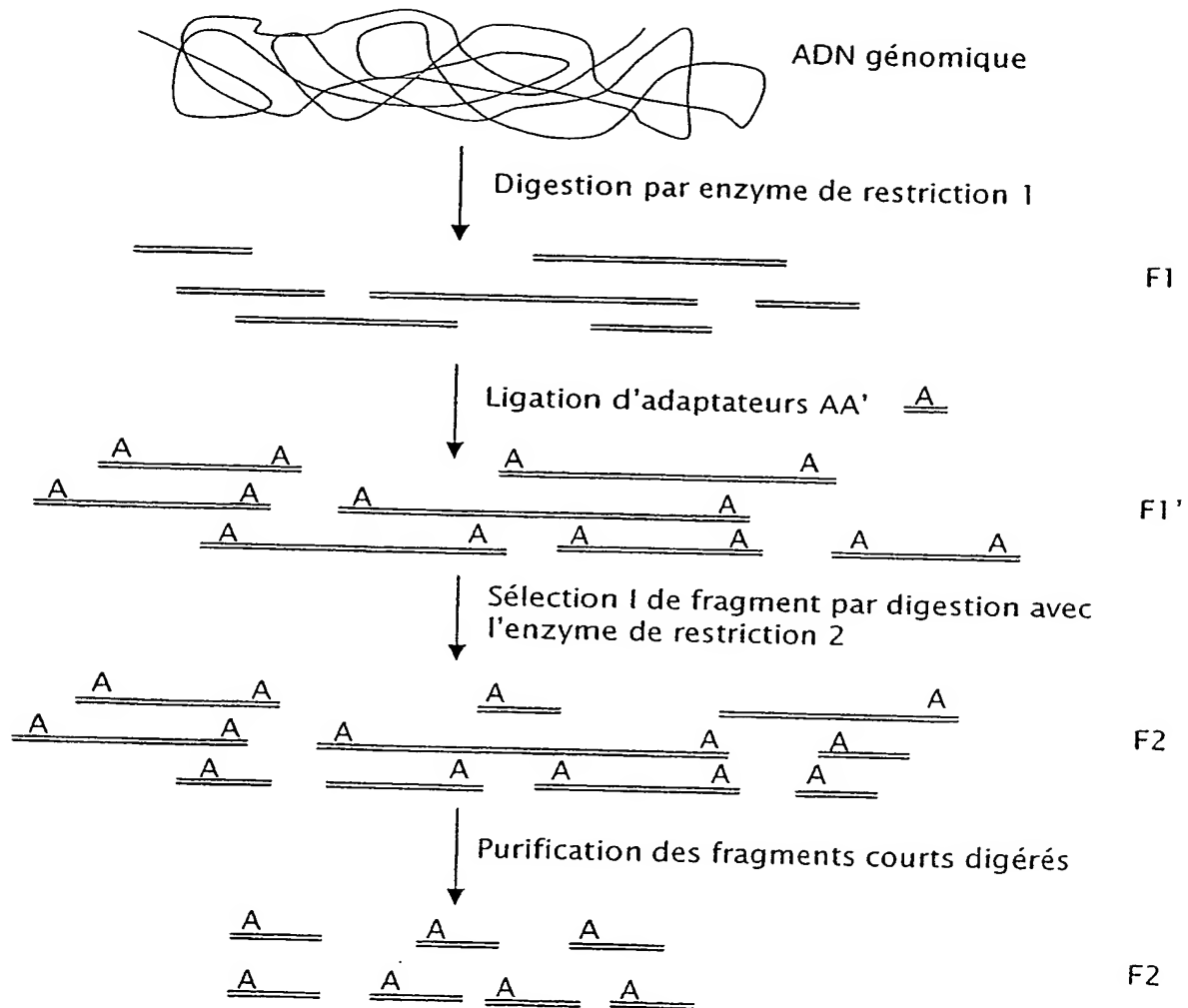
20 29°) Kit selon la revendication 28, caractérisé en ce qu'il comprend également une sonde oligonucléotidique complémentaire dudit fragment d'ADN.

30°) Utilisation d'un adaptateur AA' tel que défini à l'une quelconque des revendications 7 à 11 en combinaison avec une enzyme de restriction E2 telle que définie à la revendication 1, pour la préparation de marqueurs génétiques tels que définis à l'une quelconque des revendications 21 à 23.

25 31°) Kit pour la mise en œuvre du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 20, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un adaptateur AA' tel que défini tel que défini à l'une quelconque des revendications 7 à 11 et une enzyme de restriction E2 telle que définie à la revendication 1.

30 32°) Kit selon la revendication 31, caractérisé en ce qu'il comprend également au moins un adaptateur BB' tel que défini à la revendication 1, 16 ou 17 et un couple d'amorces, telles que définies à la revendication 1 ou 18.

1/14

Figure 1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

2/14

Enzyme E1	Enzyme E2	Nombre de bases sélectionnées		Nombre de sous groupes (empreintes) potentiels
		En 5'	En 3'	
<u>Bam HI</u> ↓ GGATCC CCTAGG	+ <u>Mme I</u> TCCPuAC.....20 AGGPYTG.....18	1/32 (2x4x4)	1/16 (4x4)	16
<u>Eco RI</u> ↓ GAATTC CTTAAG		1/128 (4x2x4x4)	1/16 (4x4)	16
<u>Pst I</u> ↓ CTGCAG GACGTC		1/256 (4x4x4x4)	1/256 (4x4x4x4)	256
<u>Msp I</u> ↓ CCGG GGCC	+ <u>Bsm FI</u> GGGAC.....10 CCCTG.....14	1/64 (4x4x4)	1/256 (4x4x4x4)	256
<u>Xma CI</u> ↓ CCGGG GGGCC		1/16 (4x4)	1/256 (4x4x4x4)	256
<u>Msp I</u> ↓ CCGG GGCC		1/256 (4x4x4x4)	1/16 (4x4)	16
<u>Eco 56I</u> ↓ CCGGG CGGCC	+ <u>Ecl I</u> GGCGGA.....11 CCGCCT.....9	1/64 (4x4x4)	1/16 (4x4)	16
<u>Ksp I</u> ↓ CCGGG GGGCC		1/4 (4)	1/16 (4x4)	16

Figure 2

THIS PAGE BLANK (USPTO)

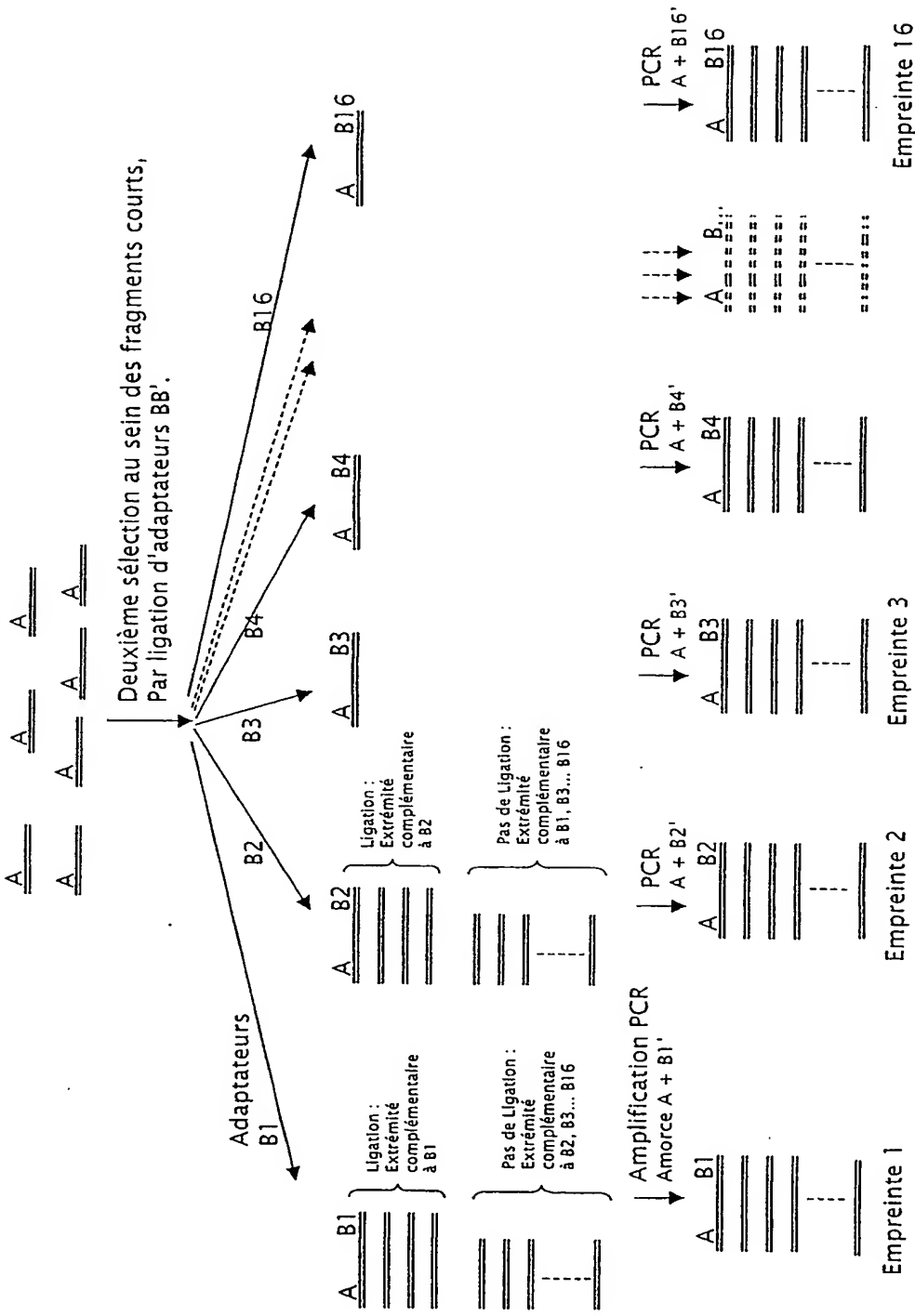


Figure 3

JC12 Rec'd PGT/PTC 18 OCT 2005

THIS PAGE BLANK (OSP10)

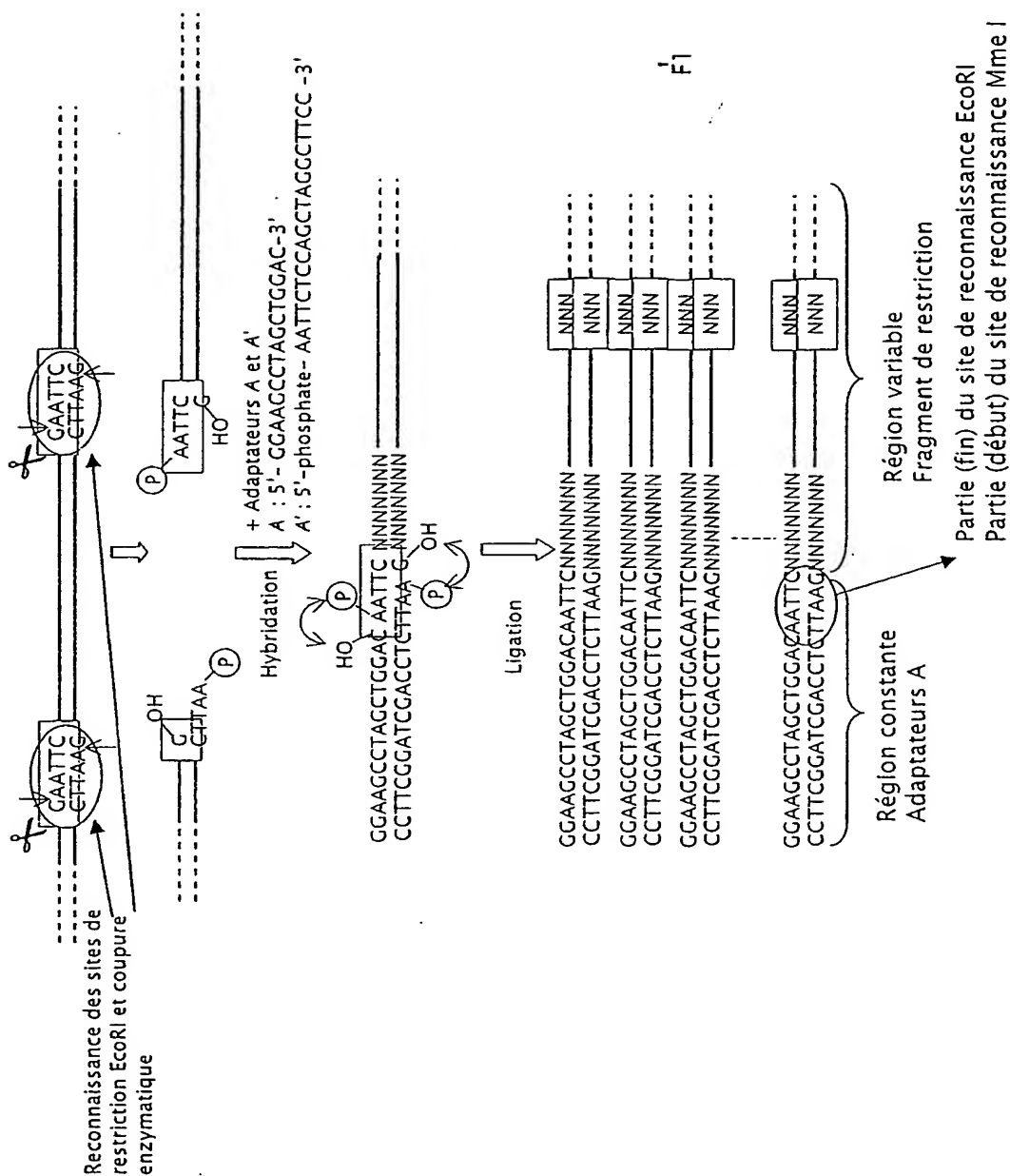


Figure 4-1

10/553603

THIS PAGE BLANK (USPTO)

5/14

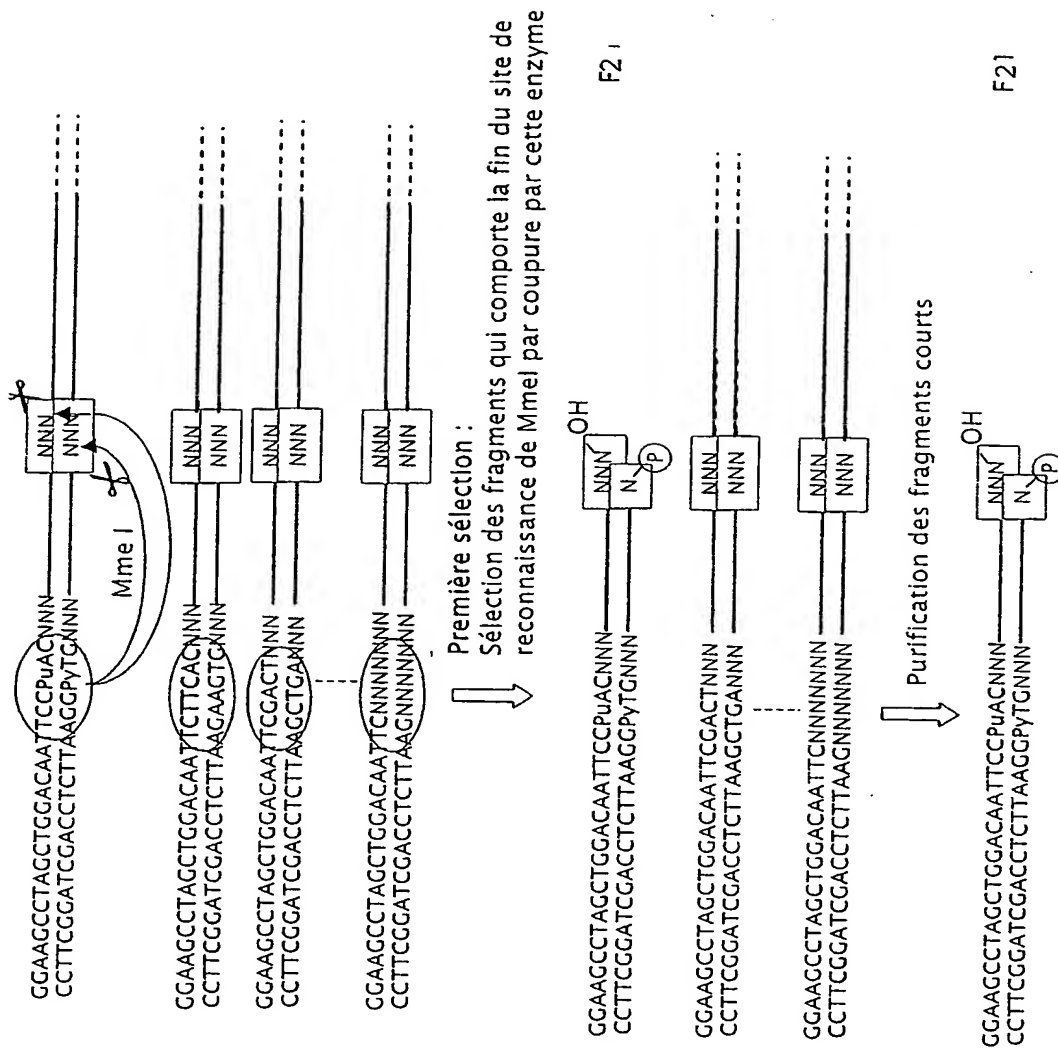
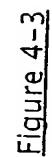


Figure 4-2

THIS PAGE BLANK (USPTO)



THIS PAGE BLANK (USPIO)

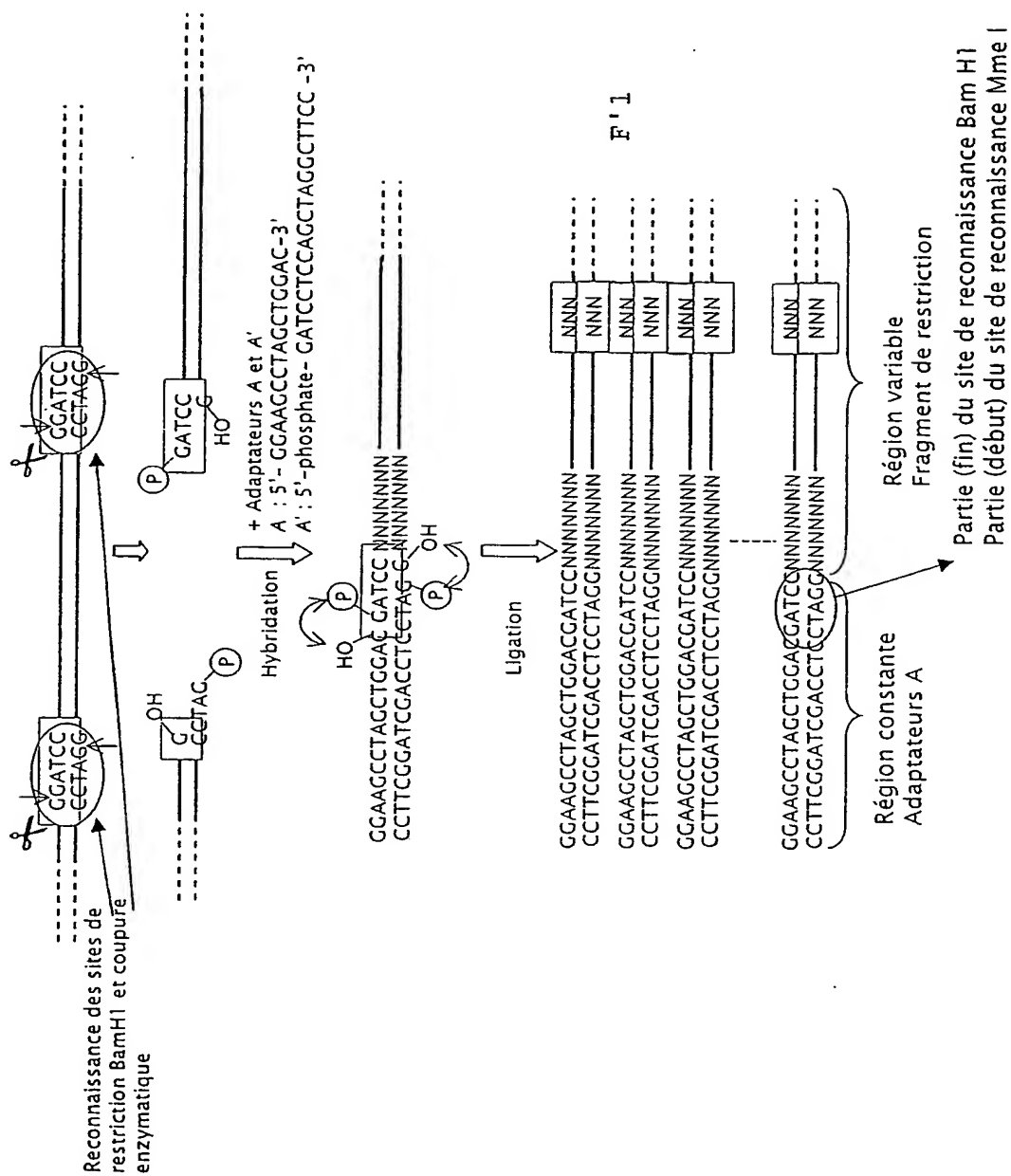


Figure 5-1

1

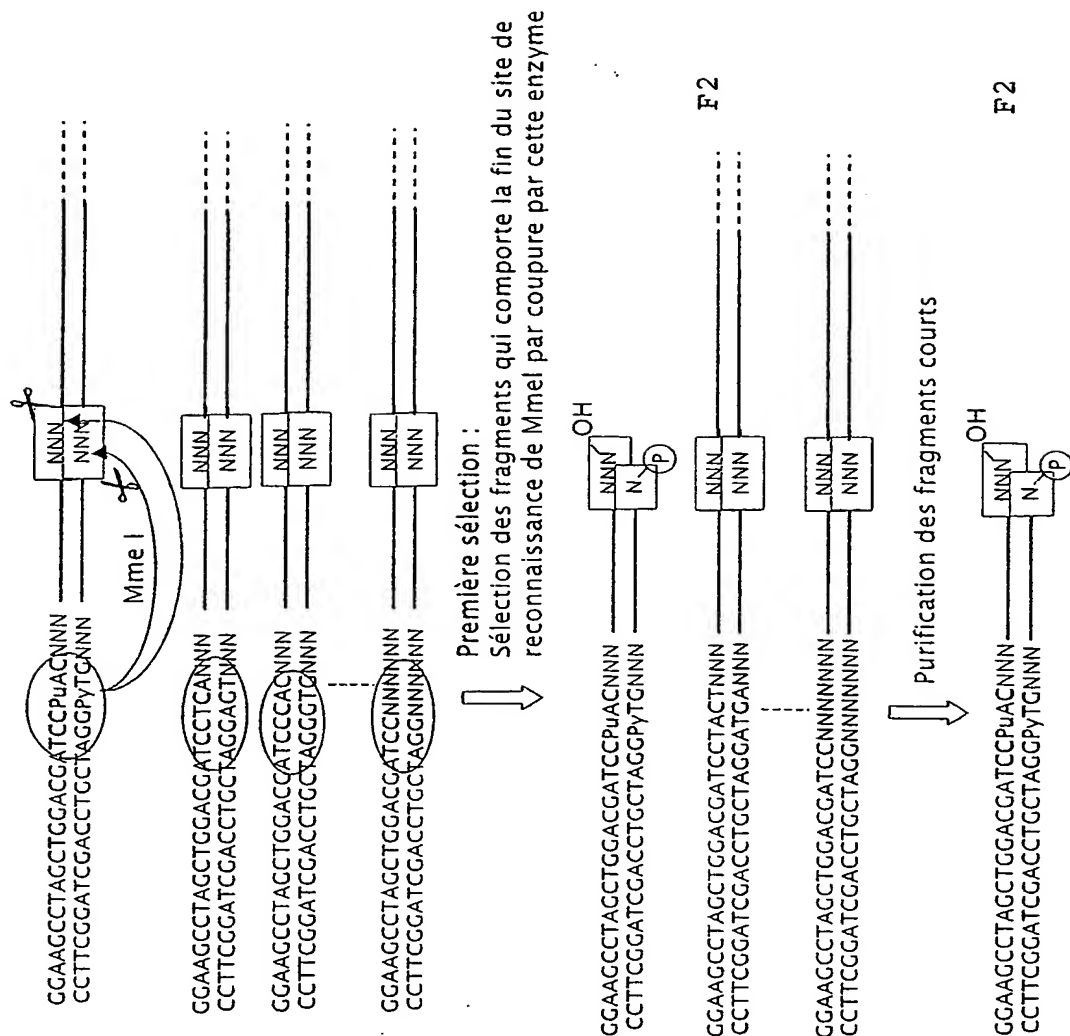


Figure 5-2

10/553603

THIS PAGE BLANK (USPTO)

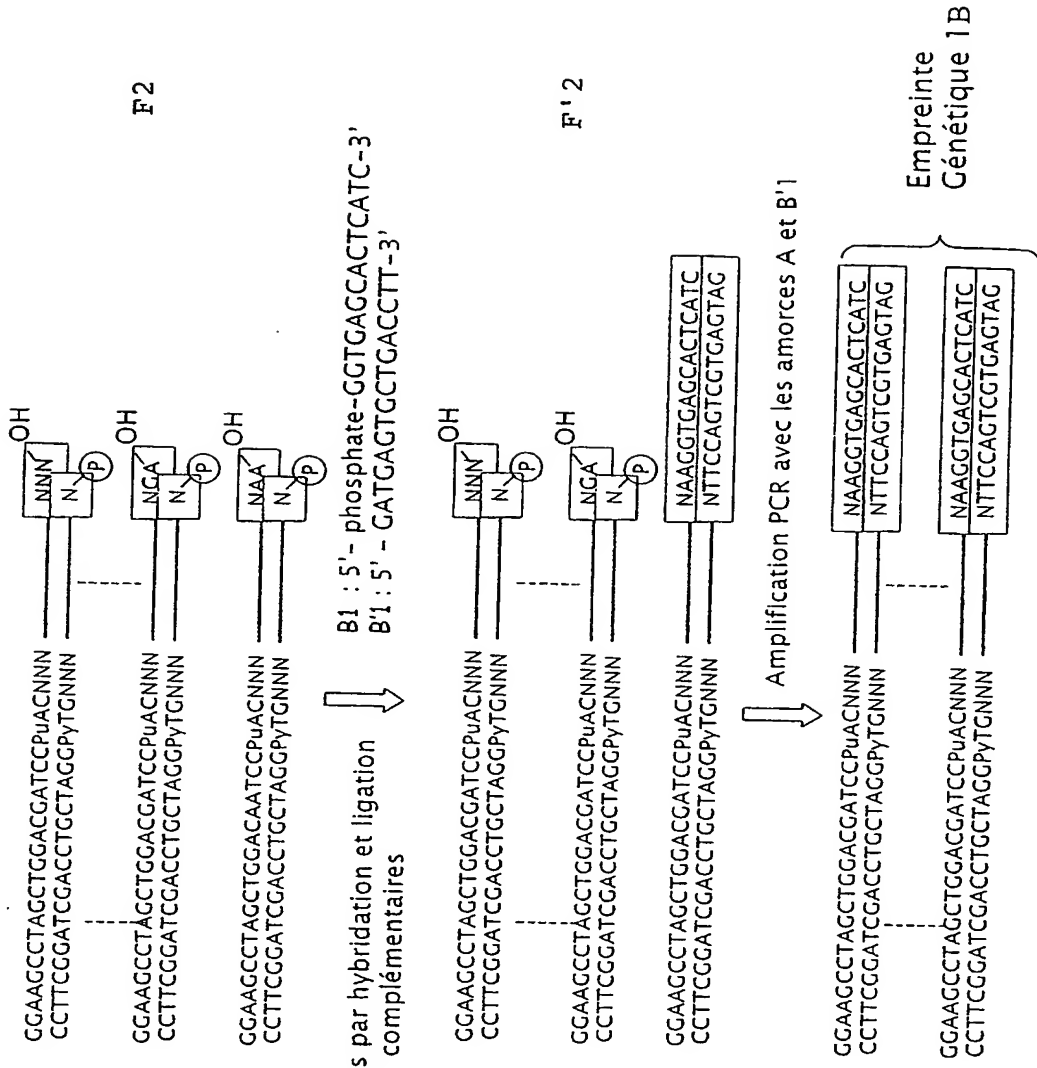


Figure 5-3

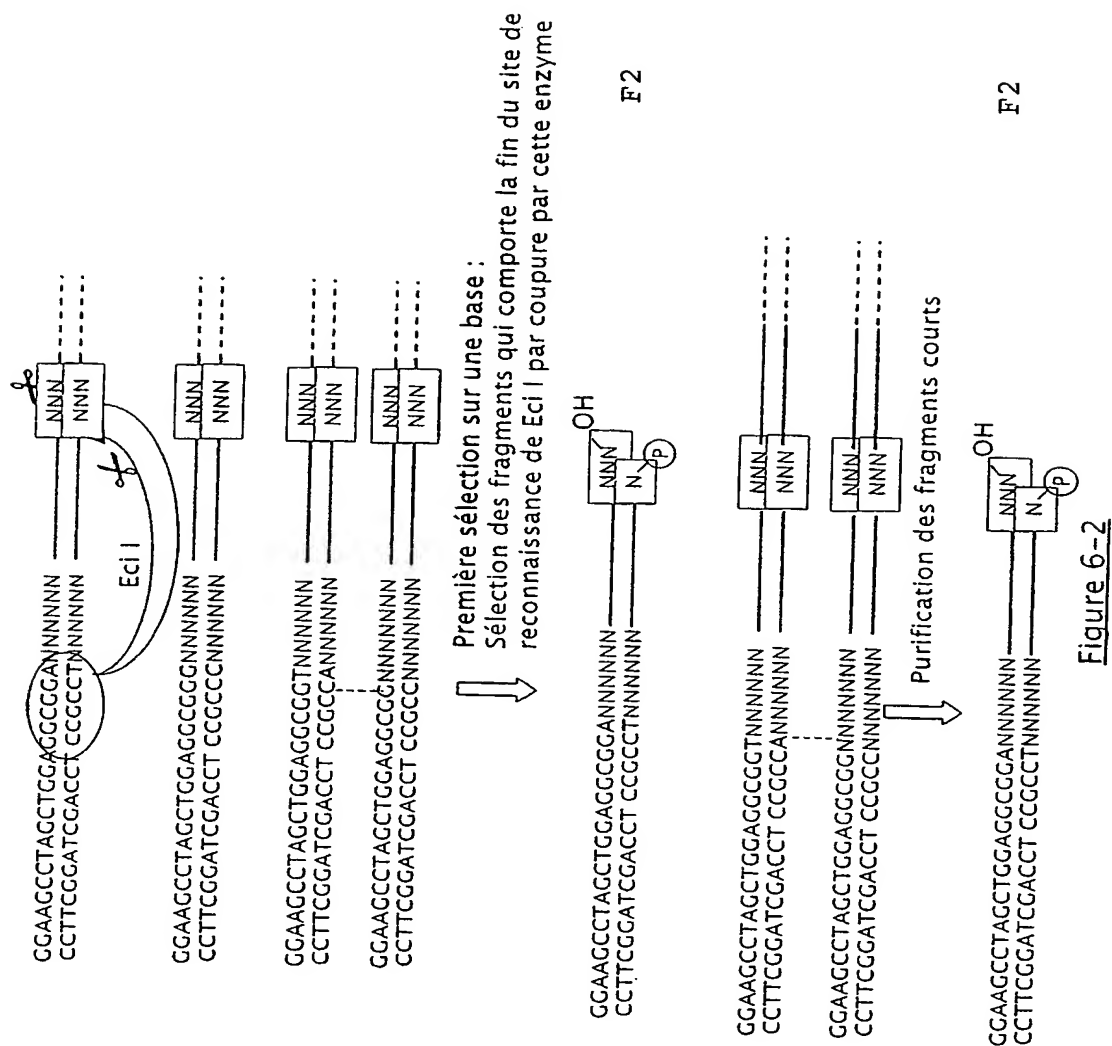
THIS PAGE BLANK (USPTO)

Figure 6-1

2005 OCT 28 12 38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

11/14



JC12 Rec'd PCT/PT 18 OCT 2005

THIS PAGE BLANK (USPTO)

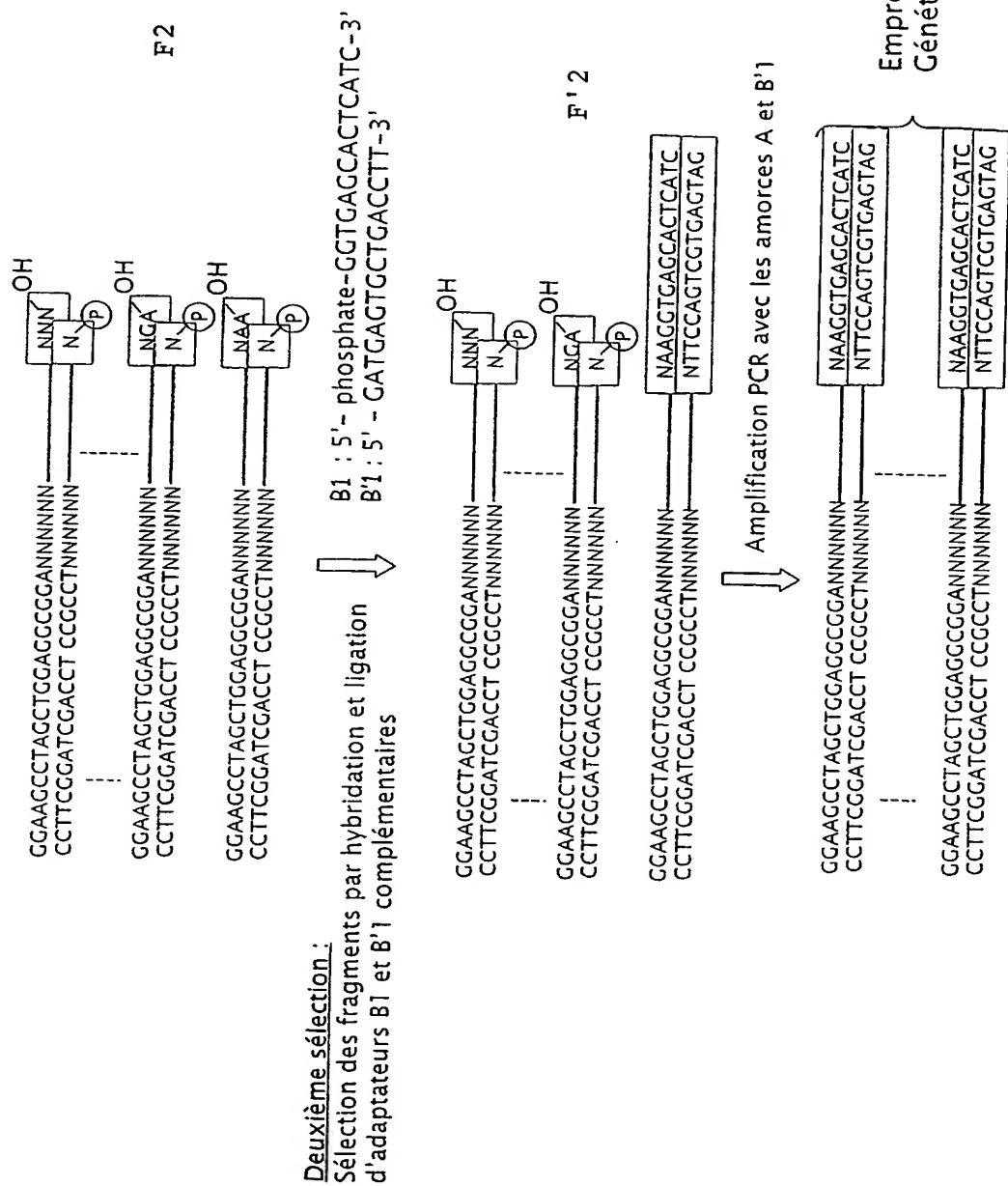


Figure 6-3

SEP 2005

THIS PAGE BLANK (USPTO)

13/14

Enzyme E1 _A			Enzyme E2			
Nom	Site de restriction	Sélection 1 des fragments par la coupure 1 (étape a)	Nom	Site de restriction	Sélection 2 des fragments par la coupure 2 (étape c)	Sélection 3 éventuelle des fragments (étapes e et f)
<i>Taq^α I</i>	-TCGA -AGCT	gouvernée par E1 _C	<i>BseR I</i>	- <u>GAGGAG</u> N ₁₀ -CTCCTCN ₈	$\frac{1}{-} - \frac{1}{-}$ 4 ⁴ 256	$\frac{1}{-} - \frac{1}{-}$ 4 ² 16
<i>Msp I</i>	-CCGG -GGCC	gouvernée par E1 _C	<i>BsmF I</i>	- <u>GGGAC</u> N ₁₀ -CCCTGN ₁₄	$\frac{1}{-} - \frac{1}{-}$ 4 ³ 64	$\frac{1}{-} - \frac{1}{-}$ 4 ⁴ 256
<i>Msp I</i>	-CCGG -GGCC	gouvernée par E1 _C	<i>Eci I</i>	- <u>GGCGG</u> AN ₁₁ -CCGCCTN ₉	$\frac{1}{-} - \frac{1}{-}$ 4 ⁴ 256	$\frac{1}{-} - \frac{1}{-}$ 4 ² 16
<i>Msp I</i>	-CCGG -GGCC	gouvernée par E1 _C	<i>Fok I</i>	- <u>GGATG</u> N ₉ -CCTACN ₁₃	$\frac{1}{-} - \frac{1}{-}$ 4 ³ 64	$\frac{1}{-} - \frac{1}{-}$ 4 ⁴ 256

Figure 7

3012-13010411 18 OCT 2005

THIS PAGE BLANK (USPTO)

14/14

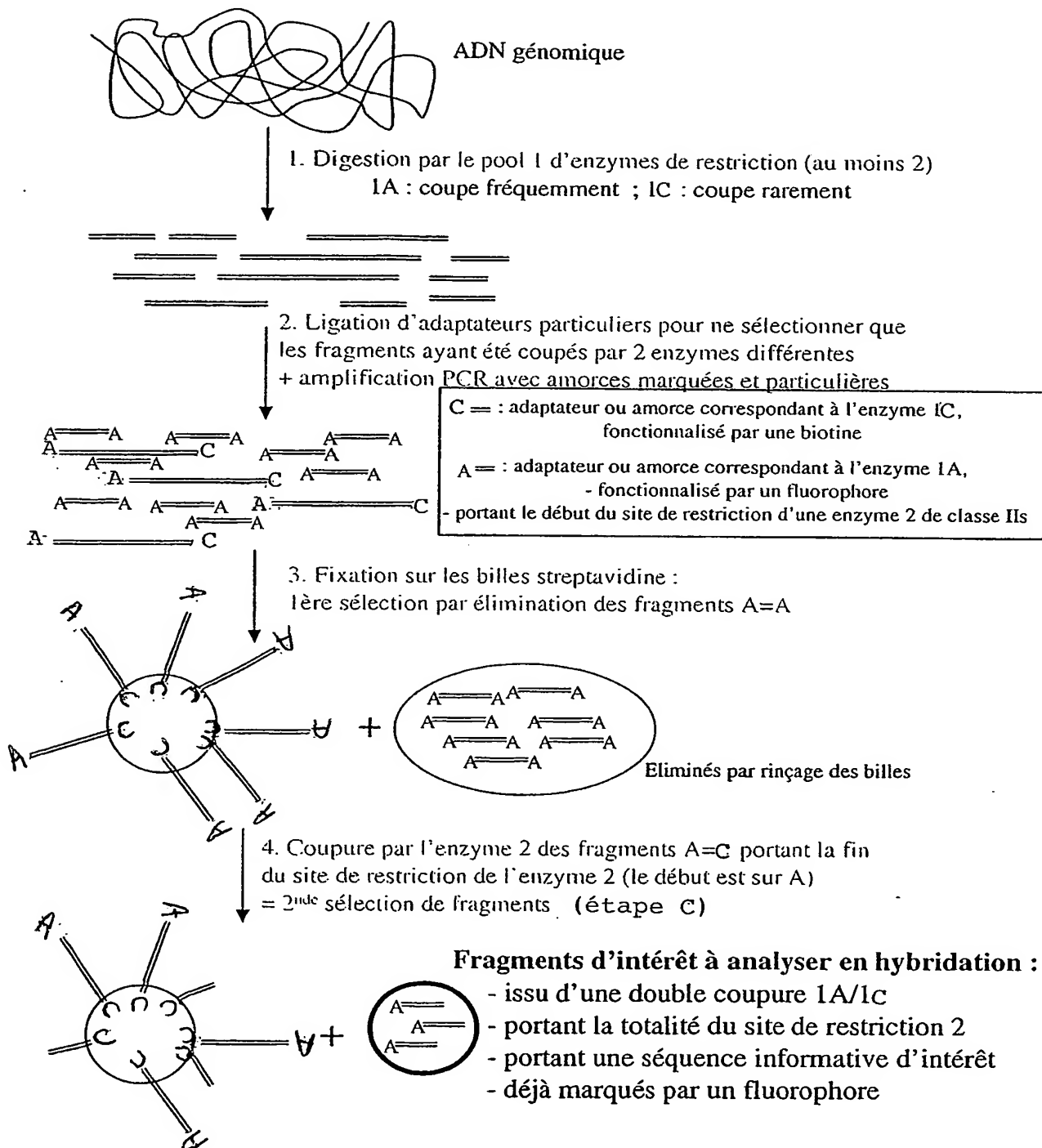


FIGURE 8

THIS PAGE BLANK (USPTO)

S263EXT94.ST25
SEQUENCE LISTING

<110> Commissariat à l'Energie Atomique
Université Joseph Fourier
Centre National de la Recherche Scientifique
BRACHET, Anne-Gaëlle
RIZO, Philippe
TABERLET, Pierre

<120> Procédé de préparation de fragments d'ADN par fragmentation sélective des
acides nucléiques et ses applications

<130> 263EXT94

<160> 13

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 15

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> brin A de l'adaptateur AA'

<400> 1
ggaagcctag ctgga

15

<210> 2

<211> 16

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> brin A de l'adaptateur AA'

<400> 2

THIS PAGE BLANK (USPTO)

ggaagcctag ctggac

s263EXT94.ST25

16

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> brin A' de l'adaptateur AA'

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> phosphate

<400> 3

aattctccag ctaggcttcc

20

<210> 4

<211> 14

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> brin B de l'adaptateur BB'

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> phosphate

<400> 4

ggtgagcact catc

14

<210> 5

<211> 16

<212> DNA

<213> artificial sequence

THIS PAGE BLANK (USPTO)

s263EXT94.ST25

<220>

<223> brin B' de l'adaptateur BB'

<400> 5

gatgagtgc t gacctt

16

<210> 6

<211> 16

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> amorce sens

<400> 6

ccttcggatc gacctg

16

<210> 7

<211> 16

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> amorce anti-sens

<400> 7

ctactcacga gtggaa

16

<210> 8

<211> 16

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> brin A de l'adaptateur AA'

<400> 8

gacgatgagt cctgac

16

<210> 9

<211> 18

<212> DNA

THIS PAGE BLANK (USPIO)

s263EXT94.ST25

<213> artificial sequence

<220>

<223> brin A' de l'adaptateur AA'

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> phosphate

<400> 9
cggtcaggac tcacgctc

18

<210> 10

<211> 18

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> brin C de l'adaptateur CC'

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> phosphate

<400> 10
aattggtacg cagtctac

18

<210> 11

<211> 14

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> brin C' de l'adaptateur CC'

<400> 11
gtagactgacg tacc

14

THIS PAGE BLANK (USPIO)

s263EXT94.ST25

<210> 12

<211> 18

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> amorce sens

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Cy3

<400> 12

gacgatgagt cctgaccg

18

<210> 13

<211> 18

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> amorce anti-sens

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> biotine

<400> 13

gtagactgcg taccaatt

18

THIS PAGE BLANK (USPTO)